LES

MATIÈRES GRASSES

DU SANG

DU MÊME AUTEUR

Synthèse nouvelle de l'alcool. Procédés et appareils brevetés en France et à l'Étranger, brevet allemand n° 149-893. 21 juin 1902.

Siphons distributeurs à volume constant et à volume variable. Brevetés, 5 juillet 1902.

L'Alimentation et la Science. (*Revue l'Alimentation*, n° 1, janvier 1905).

Sur le lait lécithiné. (*Presse médicale*, n° 104, 27 décembre 1905).

De l'emploi des ferments en vue de la désinfection intestinale. Conférence faite à l'hôpital Tenon. (*Presse médicale*. n° 8, 26 janvier 1907).

Recherche de l'or par la voie humide dans les sables aurifères. (*Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, 18 février 1907).

Quelques aperçus sur la nutrition et les fermentations. Leçons faites à l'hôpital Tenon (juin 1907). (Brochure Masson, éditeur, Paris).

Ce qu'on doit entendre par ferments lactiques. Conférence faite à l'hôpital Tenon. (*La Tribune Médicale*, 18 avril 1908).

Sur une méthode de dosage des lipoïdes dans le sang. (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, séance du 31 janvier 1914).

Sur le dosage des acides lipoïques dans le sang. (*Comptes rendus de la Société de Biologie*. séance du 14 mars 1914).

A propos de la méthode « acétone-savons d'argent ». (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 28 mars 1914).

Techniques des préparations opothérapiques. Conférence faite à l'Hôtel-Dieu, le 2 juillet 1914. (*Service du Dr Caussade, médecin des hôpitaux*).

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1915 — N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

ALBERT FOURNIER

Ancien préparateur à la Faculté des Sciences de Paris.

LES MATIÈRES GRASSES DU SANG

MÉTHODES DE DOSAGE

L'Expérience corrige les écarts de l'Imagination.

Président : M. DESGREZ, *Professeur*.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE

1915

A LA MÉMOIRE
DE MA GRAND'MÈRE MATERNELLE

dont la tendre sollicitude me fut toujours
un réconfort et un encouragement.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/lesmatieresgrass0004albe

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre nos études médicales, nous avons travaillé les mathématiques, la physique et la chimie ; et c'est d'abord (1894-1895), comme chimiste-chef d'épreuves à la Poudrerie Nationale de Saint-Médard-en-Jalles (*), — où nous avons fait nos débuts de chimiste analyste, — ensuite, pendant les neuf années suivantes, comme préparateur à la Sorbonne, que nous avons poursuivi la culture de cette dernière science.

Nous étions donc prédisposé à nous intéresser plus spécialement aux côtés chimiques des différentes branches des sciences médicales et, quand M. le professeur agrégé Castaigne, de la Faculté de Médecine de Paris, en janvier 1912, nous engagea à l'étude des matières grasses du sang, c'est avec la foi de l'enthousiasme que nous avons entrepris de nous éclairer dans ce domaine plein de promesses et aux horizons si vastes.

Ce fut un dur labeur : trois ans de recherches bibliographiques et de travaux de laboratoire.

Mais les joies scientifiques dont nous lui sommes redevables nous font oublier l'amertume de certaines déceptions et nos sentiments de gratitude s'élèvent tout naturellement jusqu'à celui qui nous a ouvert si largement les portes de ses services aux hôpitaux Beaujon et de la Charité.

A côté de M. Castaigne, les années accumulées depuis 1890 où, non sans émotion, nous portions nos premiers pas à la

(*) Encore dirigée aujourd'hui par l'éminent ingénieur des poudres et salpêtres, M. Dou.

Faculté des Sciences de Bordeaux, les années, disons-nous, n'ont pu atténuer les souvenirs reconnaissants dûs à nos initiateurs en sciences et en médecine.

Nous écoutons encore les explications savantes de mathématiciens tels que MM. Rayet, Brunel et Devaux.

Nous suivons toujours, des gradins de l'amphithéâtre de physique, la parole élégante et précise de M. Pionchon qui, tantôt par des déductions mathématiques ardues, tantôt par les expériences les plus ingénieuses, savait nous intéresser sans relâche, cependant, qu'une autre fois, le lumineux bon sens et les comparaisons imagées et saisissantes de M. Morizot donnaient aux questions les plus hautes, la clarté de la simplicité.

Des professeurs émérites nous apprirent la chimie : M. Gayon, correspondant de l'Institut; M. Joannis, dont nous fûmes plus tard le préparateur et avec lequel nous avons passé des années qui nous demeurent précieuses; M. Armand Gautier, créateur d'une œuvre universellement estimée; notre président, M. Desgrez, dont les travaux font autorité, qui voudra bien accepter ici, tout spécialement, l'hommage de notre reconnaissance.

Enfin, dans les hôpitaux parisiens, nous reçûmes les enseignements des maîtres les plus éminents :

A Laënnec, le professeur Landouzy, aujourd'hui doyen de la Faculté de Médecine, par ses réflexions profondes ou attiques et ses belles leçons, entretenait les idées les plus hautes, sur leur future profession, chez ses élèves.

A Broca, le professeur Pozzi, le célèbre gynécologue, duquel la bienveillance inépuisable nous fut d'un si grand réconfort.

Nous est-il possible aussi d'oublier l'attrait des cours si captivants du professeur Bar à la clinique Tarnier, de plus intervenant lui-même, à chaque occasion, auprès de ses auditeurs, pour en parfaire l'éducation professionnelle, aidé de ses auxiliaires dévoués, les chefs de clinique Lequeux et Devraigne que nous ne pouvons séparer du chef dans notre souvenir.

MM. les professeurs agrégés Rénon et Walther enseignaient à l'ancienne Pitié, où assidûment nous suivions leurs cliniques. Nous ne saurions trop dire tout ce que nous devons à

ces maîtres à la fois si bons pour leurs malades, si bienveillants pour leurs disciples, si aimés de tous. Ils voulaient leurs leçons essentiellement pratiques et réussissaient sans peine à inculquer à leurs élèves la notion du haut devoir social auquel bientôt ils seraient assujettis dans l'exercice de leurs fonctions, à la fois peut-être les plus délicates, les plus belles et les plus redoutables dont un homme puisse être investi.

Dans l'établissement de ce travail, nous nous sommes livré à des recherches bibliographiques étendues. Nous en avons puisé les éléments presque toujours dans les Bibliothèques Nationale et Sainte-Geneviève et les Bibliothèques universitaires de la Sorbonne, de la Faculté de Médecine et de la Faculté de Pharmacie. Nous adressons ici nos remercîments à MM. les bibliothécaires Lemaire, de la Sorbonne, et docteurs Hahn et Dorveault, des Facultés de Médecine et de Pharmacie, qui nous ont obligeamment fourni des indications utiles.

Malgré cela, nous ne prétendons pas être complet. Heureux si nous avons réussi à mettre en lumière les faits essentiels qu'on peut considérer comme les fondements de la *Science lipohématologique*.

LES MATIÈRES GRASSES DU SANG

MÉTHODES DE DOSAGE

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LE SANG ET L'ÉCONOMIE

§ 1. — Solidarité dans l'état de santé et l'état de maladie.

L'homme emprunte au milieu où il vit ses énergies vitales en y puisant ses *aliments*. Ceux-ci concourent à sa morphogénèse, à l'édification de ses cellules, à leur agrégation en appareils et en systèmes, l'ensemble formant cette machine compliquée dont le fonctionnement, au total, résume l'ensemble des travaux solidaires de toutes les parties de l'économie.

Et cette solidarité — cas particulier de la grande loi de solidarité universelle — est assurée à la fois par le système nerveux et par la circulation des humeurs de l'organisme.

Directement ou indirectement, transformés ou non, les aliments puisés dans le milieu extérieur sont livrés à l'être vivant après les élaborations bio-chimiques du tractus digestif, le jeu des poumons distributeur de gaz comburant, le travail des muqueuses et du tégument au niveau duquel s'exercent, de surcroît, les variations auxiliaires de lumière, de chaleur, de frottement, etc.

Le sang, tissu vivant et ambulant, intermédiaire des échanges entre l'extérieur et l'intérieur, entre les diverses régions

internes elles-mêmes, joue ce rôle dès les premiers instants, sous l'égide coordinatrice, synergique, des centres nerveux, quand l'ovule fécondé a parasité l'utérus.

L'état liquide, seul capable d'adaptation complète à toutes les formes, seul capable de circulation facile et rapide, était indispensable à ce milieu nutritif dont on peut dire qu'il charrie les éléments les plus importants de la vie, tout en en recueillant corrélativement les déchets destinés à l'élimination.

Dès lors, « le rôle qu'un tel liquide doit jouer dans l'état de santé et l'état de maladie ne peut-être que fort important », selon les paroles déjà prononcées par Denis en 1838 (1).

L'état de santé — l'hérédité mise à part — est en effet un heureux équilibre entre les apports alimentaires — conçus au sens le plus général donné au terme *aliment* (2) — leur élaboration cellulaire et leur excrétion.

L'état de maladie est une atteinte portée à cet équilibre, sous l'influence de causes extérieures, sous l'influence des *aliments* modifiés en qualité, en quantité, et qui deviennent la déterminante de troubles réactionnels de la part des appareils organiques.

Les oscillations brusques ou excessives de la température, de la lumière, de l'électricité, de toutes les radiations, les actions mécaniques hors de propos ou de degré, retentissent fâcheusement sur les différents étages de l'économie. De ce fait, par suite du mouvement nutritif vicié, des sécrétions altérées, le sang, par conséquence nécessaire, se trouve lui aussi atteint dans son équilibre et sa composition.

A plus forte raison quand peuvent s'y incorporer plus directement des corps étrangers, parasitaires ou toxiques, puisés dans le tube digestif; ou bien recueillis au niveau de la muqueuse pulmonaire sous forme de gaz toxique, par exemple; au niveau d'une effraction dermique, d'une inflammation tissulaire, à l'état de toxines microbiennes ou autres; au niveau d'une glande à sécrétion interne lésée ou troublée

(1) Prosper Sylvain Denis. *Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme et à l'étude physiologico-pathologique, hygiénique et thérapeutique des altérations morbides de cette humeur* (1838).

(2) Albert Fournier : *L'Aliment et la Science*, Revue *L'alimentation*, Janvier 1905, nº 1.

dans son fonctionnement, source quelquefois intarissable de principes adultérés ou dont la quantité est trop faible ou trop forte.

Enfin, une cause puissante et fréquente d'altération du sang ne réside-t-elle pas dans l'insuffisance des émonctoires, dont le débit réduit est incapable alors d'assurer l'évacuation des matériaux usés? D'où rétention et toxhémie, déséquilibre dans la constitution mécanique, physique, chimique, physiologique du sang, maladie du sang, donc maladie de l'organisme tout entier.

En état de santé comme en état de maladie, la solidarité étroite qui lie entre elles l'économie et le sang subsiste toujours. La corrélation, la réciprocité est complète.

Quelle démonstration expérimentale plus éclatante en pourrait-on trouver sinon dans les séro-diagnostics, révélateurs, non seulement d'affections générales dans leur nature, comme la dothiénentérie, mais aussi, en particulier, de la spécificité de certaines lésions inflammatoires localisées, tuberculeuses entre autres?

Les immunisations, la thérapeutique des injections sanguines médicamenteuses, ne s'ajoutent-elles pas encore, comme autant de preuves?

De même, souvent, n'est-ce pas un examen microscopique ou chimique du sang qui permet de déceler une affection ou de la confirmer quand elle est soupçonnée : paludisme, filariose, parasitisme chronique intestinal ou autre, urémie, etc.?

Depuis longtemps, les cliniciens ont compris tous les avantages qu'ils pourraient retirer des interrogatoires hématiques. Mais leurs investigations ont d'abord porté sur les éléments figurés. C'était logique, parce que plus immédiat et plus facile, grâce au microscope. Au reste, c'était une imitation involontaire et fatale du fait historique en vertu duquel la microscopie du sang a de longtemps précédé son analyse chimique. Chose tout à fait naturelle à cette époque lointaine où les instruments d'optique permettaient des recherches refusées à la chimie toujours embryonnaire et non constituée en corps de doctrine scientifique.

On fait remonter effectivement à Barner, médecin du roi de Pologne, la gloire d'avoir réuni le premier (milieu du XVII[e] siècle) les phénomènes connus d'ordre chimique et fait

entrer, de la sorte, la Chimie dans la Science. Par contre, les propriétés des lentilles étaient connues depuis un siècle auparavant.

§ 2. — Comparaison entre le sang circulant et le sang épanché.

Si l'on consulte une analyse moderne du sang d'un mammifère ou de l'homme, on est frappé par sa richesse en substances de nature protéique, lesquelles dominent fortement — si l'on en excepte naturellement l'eau — par leurs proportions, toutes les autres substances dosées. Ces matières protéiques sont numériquement évaluées *in vitro*. Le sang hors de l'économie, on le sait, subit des modifications importantes. La fibrine, par exemple, n'est pas préexistante, sa formation s'accompagnant du phénomène de la coagulation.

D'une manière précise, le sang épanché est au sang circulant ce que l'être vivant qui l'a fourni serait à ce même être privé de vie, d'autant moins différents entre eux que l'intervalle de temps, depuis la mort, serait réduit. Le sang épanché, même lorsqu'il l'est depuis peu, n'est donc pas identique au sang circulant.

Cependant il y a, à n'en pas douter, communauté dans la majeure partie des constituants, et d'ailleurs on n'ignore pas que la manière de recueillir le sang et de le conserver a une influence capitale sur ses modifications en dehors de l'organisme vivant. La coagulation elle-même peut être prévenue sans addition d'aucun élément étranger, par le moyen de vases paraffinés, en évitant de la sorte le traumatisme leucocytaire auquel est attribué le point de départ de la coagulation.

L'analyse chimique *in vitro* conserve tout son intérêt quand on a su se mettre à l'abri des altérations autogènes appréciables et des modifications exogènes, les microbiennes notamment.

On pourra alors remonter de la constitution du sang épanché à celle du sang circulant. Les faits cliniques, les déductions diagnostiques et thérapeutiques justifieraient tout seuls cette conclusion. Mais il y a mieux. L'identité de beaucoup d'éléments n'est pas hypothétique. Les hématies, en

particulier, jouissent, dans les deux cas, de leur propriété d'affinité gazeuse. Du sang veineux, agité à l'air, devient rutilant; il s'artérialise, aussi bien dans nos vases qu'au niveau des alvéoles pulmonaires. De même l'oxygène est déplacé par l'oxyde de carbone avec la même facilité et de la même manière *in vivo* et *in vitro*.

Au microscope, on n'aperçoit pas de différence entre les éléments figurés circulants et les éléments figurés placés entre lame et lamelle et leur fonctionnement physiologique même ne paraît pas troublé quand on respecte certaines conditions indispensables de température, d'humidité, etc...

Ainsi, tout au moins au point de vue des hématies — et sans doute d'autres cellules — leurs propriétés fondamentales peuvent se superposer dans les deux cas.

On peut admettre qu'il en va de même envers la plupart des principes immédiats caractérisés par l'analyse. Vraisemblablement, la sérine et la globuline reconnues présentes au sein d'un sang épanché frais, le sont également au milieu du sang circulant, au moins par leurs quantités à un instant précis, si ce n'est avec leurs qualités ou l'état de leurs combinaisons, car il y a des réserves à faire sur leur instabilité physiologique, comme ces réserves sont aussi de droit au sujet de beaucoup d'autres substances. De même en ce qui concerne les matières grasses, quoiqu'on ait voulu, pour certaines d'entre elles, les faire dériver, d'une manière analogue à la fibrine, d'une effraction leucocytaire.

La grande différence qui sépare le sang circulant de l'autre, c'est évidemment l'activité vitale dont le premier est le siège. Cette activité doit varier avec les lieux comme avec le temps. Les sangs « extra cute » et « intus in cute » ne sont comparables qu'en un même lieu et à des instants peu différents.

Il existe évidemment des modifications chimiques incessantes dont l'intensité est maxima au niveau des capillaires où s'effectuent, surtout, les échanges nutritifs. En dépit de ces mutations continues, un équilibre général persiste et si la composition du sang varie insensiblement avec le temps en un même lieu à l'état normal, ces variations ne sauraient nous en faire négliger l'analyse chimique.

§ 3. — Utilité de l'analyse du sang.

L'analyse chimique du sang *récemment extrait* d'un vaisseau à un niveau déterminé, fournit des matériaux que l'on peut partager en divers groupes. Ceux qu'il est possible de considérer comme suffisamment stables et de proportions peu variables faisant partie réellement de la constitution du sang circulant : hémoglobine, certains sels comme le chlorure de sodium, très vraisemblablement la majeure partie des albuminoïdes, une certaine quantité des matières grasses, etc., auxquels on pourrait ajouter les matériaux d'excrétion ; en second lieu, des substances susceptibles de transformations rapides adéquates aux effets incessamment renouvelés auxquels elles sont appelées à pourvoir, substances sur la composition desquelles on ne possède que des données obscures, corps fragiles et éphémères, d'action considérable souvent, malgré leurs faibles quantités, diastases, anticorps, hémolysines, etc... Enfin, une catégorie à part doit comprendre les corps de formation externe, comme la fibrine.

De quelque origine qu'ils soient, tous ces éléments sont intéressants et parfois très utiles à déterminer et à doser quand on le peut, les uns parce qu'ils représentent vraiment l'état dans lequel ils se trouvent au sein de l'économie vivante, les autres en raison des déductions qu'il est, malgré tout, souvent possible de tirer de leur connaissance plus ou moins approchée.

Ce n'est pas tout. La Science pure, la Biologie générale ou comparée, la spéculation philosophique trouvent encore leur compte à l'étude du sang *in vitro*. Cela est d'évidence et nous dispense d'y insister. Les observations concernant les hématies et les hémoglobines suivant les espèces, les dissertations sur la coagulation en sont des preuves immédiates, même en voulant ignorer leurs applications au domaine de la Pathologie.

L'analyse d'une saignée est donc de réelle importance. Elle peut conduire à une connaissance suffisante du sang vivant circulant et permettre d'en tirer des déductions d'une haute portée, applicables à tous les champs de l'activité intellectuelle.

Des expressions populaires diverses relatives au sang, traduisant l'état de santé ou de maladie, sont, sans doute, aussi vieilles que l'humanité pensante. Ensuite, quand les hommes de science ont porté leur attention sur la nature des êtres vivants, on peut dire que le sang a été l'un des premiers à les captiver.

« Le sang est une chair coulante » (Bordeu), « il a le caractère de ce qui a vie » (Denis) (3), c'est un milieu vivant, intermédiaire entre la cellule et le dehors, à la fois nourrisseur et purgeur de la cellule. L'état physiologique ou pathologique de la cellule dépend naturellement de la composition de son milieu nutritif, et inversement la composition de l'humeur sanguine suit l'état physiologique ou pathologique cellulaire. Cette solidarité par réciprocité n'est qu'un cas particulier d'une loi générale. Admise, elle suffit à conclure de l'état du sang à un état corrélatif de l'économie tout entière. L'utilité de l'hématologie analytique en Pathologie serait donc ainsi, d'un autre côté et d'une manière indirecte, *a priori* démontrée.

La pratique a pleinement confirmé ces prévisions. Depuis longtemps et chaque jour la clinique retire ainsi les plus larges avantages des travaux du laboratoire. L'hématocytologie, la résistance globulaire, les séro-diagnostics, etc., sont devenus d'usage courant. Dès aujourd'hui, les principes immédiats, intéressants il y a peu de temps encore aux yeux des seuls chimistes, prennent soudain une importance de premier plan dans l'esprit médical. Déjà l'urée est pratiquement déterminée depuis un certain nombre d'années. Des cliniciens de l'autorité des professeurs Widal, Chauffard, Gilbert, ont ouvert des voies nouvelles à la pathologie et à la thérapeutique, en orientant les recherches du côté des pigments et des sels biliaires et plus récemment encore du côté des matières grasses et des lipoïdes.

L'utilité de l'analyse du sang n'est donc pas contestable. Elle ne l'a jamais été du reste. De tout temps les médecins et les chimistes ont compris la valeur des recherches hématologiques et particulièrement dans leurs rapports avec la médecine.

Englobant dans son jugement tous les fluides animaux étu-

(3) *Loc. cit.* p. 2.

diés par les auteurs qu'il cite, Fourcroy (4) en 1791, s'exprime ainsi : « Cependant les recherches de quelques modernes, « surtout de MM. Rouelle, Macquer, Bucquet, Poulletier de « la Salle, Berthollet, Proust, Scheele et Bergmann, ont « ouvert une carrière nouvelle et annoncent que l'art de guérir « pourra retirer de grands avantages de ce genre de travail. »

Depuis Fourcroy, ses prédictions se sont constamment réalisées, surtout de nos jours. Le dosage de l'urée sanguine, la détermination du rapport azoténique, fournissent très souvent un élément précieux de pronostic. Des diagnostics n'acquièrent toute leur signification et souvent toute leur réalité qu'après un examen hématique. Nous en avons cité des exemples frappants au point de vue parasitaire Les anémies, les leucocytoses, sont étudiées avantageusement dans leur évolution par des observations microscopiques répétées. Enfin, tout récemment, la cholalihémométrie, la cholestérinhémométrie, la lipohémométrie, sont entrées dans la pratique habituelle du laboratoire.

Chimiquement, comme nous le disions sous une autre forme au début de ce paragraphe, les matériaux du sang peuvent se grouper en trois grandes catégories : les matériaux destinés à l'assimilation, par conséquent nécessaires à l'entretien de la vie; les matériaux destinés à l'évacuation, ayant pour origine la désassimilation, dont le cumul dans l'appareil circulatoire constituerait un déséquilibre physiologique capable conséquemment d'entraîner des troubles ou même des lésions pathologiques; la troisième concerne des substances peu connues dont on sait néanmoins qu'elles tiennent souvent des rôles considérables.

Les corps de la première catégorie arrivent au sang de l'extérieur, soit sous leur forme primitive, comme l'oxygène, soit après une élaboration dont les actes successifs constituent les phénomènes de la digestion.

Ceux de la seconde catégorie sont recueillis par des émonctoires divers, généralement glandulaires, dont le plus important est l'appareil rénal. C'est dans l'urine, en effet, que viennent s'accumuler, en fin de compte, la plupart des déchets de

(4) Antoine François de Fourcroy. *Éléments d'histoire naturelle et de chimie*, 1791, t. IV, p. 294.

l'organisme, moins les gazeux, qui rencontrent une voie d'exil plus directe au niveau des poumons.

Les produits n'ayant plus aucun rôle physiologique à accomplir sont évidemment des substances dont l'organisme cherche à se débarrasser. Leur détermination en nature et en quantité dans l'urine, présente un intérêt incontestable pour l'étude du métabolisme interne, surtout quand on a pu s'assurer d'un inventaire sérieux des matériaux correspondants présentés sous forme d'aliments (air, aliments proprement dits, etc.). En sorte qu'un bilan peut être établi entre les entrées et les sorties. Si nous ignorons le mécanisme interne, nous en savons les résultats.

Toutefois, la connaissance du milieu sanguin, immédiatement intéressé aux échanges organiques, est d'un prix au moins égal, sinon supérieur. Sans doute l'analyse de l'urine est plus aisée, principalement parce que les éléments dont la clinique fait le plus de cas, actuellement, s'y trouvent en quantité notable. L'analyse du sang est, au contraire, plus délicate ; elle exige en outre une *intervention* ; les dosages réclamés par la clinique y portent sur des substances dont la teneur est faible et, d'autre part, accroissement de difficulté, on ne dispose, pour l'évaluation d'une même substance, que d'une quantité de sang généralement très inférieure à celle de l'urine correspondante. L'urée, par exemple, trouvée dans l'urine, recherchée ensuite dans le sang, le fut vainement d'abord. En effet, alors que le rapport de sa quantité à son véhicule est d'environ 20 p. 1000 dans le premier cas, il n'est plus que de 1 p. 1000 dans le second cas ; alors qu'il est facile d'évaluer 0 gr. 020 d'urée dans 1 centimètre cube d'urine, il faut 20 centimètres cubes de sérum pour y apprécier la même quantité de ce corps.

L'urine contient aussi beaucoup de chlorure de sodium. Ce sel, cependant, n'est pas un produit de désassimilation. Au contraire, il prête son concours à la nutrition. Pour respecter le jeu normal de cette dernière, il doit se rencontrer en quantité déterminée dans les humeurs, y compris le sang. Il tient sa partie dans l'équilibre physiologique général. Il se perd dans l'urine et autres émonctoires, mais est remplacé au fur et à mesure pas des apports alimentaires équivalents. Nous mentionnons simplement ici son rôle, mis en évidence par M. Widal, dans certains syndrômes où figure la réten-

tion chlorurée. Le chlorure de sodium est un terme de passage dont le dosage habituel, dans le sang, présenterait un intérêt certain.

En serait-il de même des éléments constitutifs dont la présence paraît évidemment liée au premier acte de la nutrition, c'est-à-dire l'assimilation? Les matières protéiques en particulier, dont les mutations sont corollaires de l'accroissement ou simplement de la constance du substratum animal, ne seraient-elles pas, par leur qualité ou leur quantité, indicatrices au premier chef des déchéances fonctionnelles ou organiques?

§ 4. — Matières grasses du sang. — Lipoïdes.

Quoi qu'il en soit de cette question délicate, d'autres corps qui semblent bien appartenir aussi à la catégorie des substances assimilables ou jouant un rôle actif dans la nutrition, sont aujourd'hui dosés nettement au profit du diagnostic et du pronostic. Il s'agit des matières grasses et des lipoïdes.

Le mot *lipoïde* signifie étymologiquement une matière *qui ressemble aux graisses*. Overton l'emploie pour la première fois en 1900. Etudiant le mécanisme des narcotiques sur l'organisme, il cherche à démontrer qu'il réside dans l'affinité particulière de ces derniers, envers certaines subtances des éléments nerveux, capables d'être extraites, comme les graisses, au moyen de l'éther, du chloroforme, de la benzine, etc. Ces substances, auxquelles Overton fait jouer un rôle si considérable dans la narcose, sont connues depuis longtemps. Ce sont principalement les cholestérines et les lécithines.

Evidemment, on ne peut définir des substances par leurs caractères de solubilité dans l'éther ou le chloroforme. Overton s'était placé à un point de vue bien spécial. Sa définition s'adaptait au mobile qui l'avait fait naître.

Les cholestérines accompagnent souvent les graisses. Elles s'y dissolvent avec facilité et c'est peut-être le seul point qu'elles ont de commun avec elles. La plupart de leurs propriétés physiques et chimiques les en écartent complètement.

Les lécithines sont des graisses véritables. Elles sont

saponifiables, fournissent sous l'influence des alcalis des sels à acides gras et le « principe doux des huiles » de Chevreul. En cela les lécithines mériteraient vraiment le nom de lipoïdes puisque, assimilables aux graisses proprement dites, elles en diffèrent toutefois par certains côtés.

Toute substance non identifiable aux graisses mais capable de saponification, avec mise en liberté de glycérine et des acides gras voisins de ceux des corps connus sous le nom de *corps gras neutres*, devrait seule étymologiquement et logiquement porter le nom de lipoïde. Néanmoins, nous entendrons sous cette désignation toute substance à laquelle l'usage, depuis Overton, a imposé ce nom. Par conséquent, en suivant Rosenheim, les phosphatides, les galactides, les cholestérines sont des lipoïdes.

En ce qui concerne le sang, les lipoïdes dont il a été fait jusqu'ici une étude suffisante, sont la lécithine cholinique découverte par Gobley en 1851 et la cholestérine extraite par Boudet en 1833. Ce sont les seuls dont on effectue actuellement le dosage. En raison de leur importance actuelle nous leur consacrerons le paragraphe suivant.

§ 5. — Origine et rôle des hémolipoïdes.

Les cholestérines et les lécithines sont des produits de l'activité cellulaire ou d'assimilation alimentaire. Ils sont répandus partout dans le règne végétal et le règne animal en s'associant très fréquemment. Dans le premier, ils sont d'origine synthétique et minérale, les végétaux ayant une alimentation exclusivement minérale. On pourrait cependant faire quelques réserves sur l'absolutisme de cette règle, nombre de microbes, pourtant végétaux, se multipliant aux dépens des matières organiques, et certains végétaux parasites puisant directement leurs principes nutritifs dans la substance même de leur porteur, substance où l'on rencontre à la fois des corps minéraux et organiques, ces derniers n'étant peut-être pas nécessairement négligés par la vie parasite.

Chez les animaux, la question paraît beaucoup plus compliquée. Y a-t-il comme chez la plante une véritable synthèse, au moins partielle, des lipoïdes? Quoi qu'il en soit, on peut

affirmer que l'animal les rencontrant dans son alimentation, végétale ou non, en fait son profit, comme il profite des graisses et des huiles. Celles-ci, on le sait, sont dédoublées dans le tube digestif, puis se reconstituent avant de se fixer dans les différents appareils.

Quelques auteurs semblent avoir prouvé qu'il en va de même pour les lécithines. Quelques autres affirment qu'une partie au moins de la lécithine est absorbée en nature.

D'autre part, il paraît démontré qu'au niveau de certaines cellules, de certaines glandes, il y a formation, sécrétion de lécithine. Mulon accorde ce rôle aux capsules surrénales [5]. L'ovaire et d'autres glandes encore sont aussi considérés comme des lieux de lipoïpoïèse. En somme, chez l'animal, la présence des lipoïdes peut être admise comme liée, en partie, à des phénomènes concomitants d'endogénèse et d'exogénèse cellulaires.

Qu'il y ait à l'intérieur de l'organisme animal des actions de synthèse des lipoïdes, même aux dépens d'éléments purement minéraux, comme l'acide phosphorique, il n'en résulte pas moins qu'au total les lipoïdes sont soumis, comme les graisses, à la grande loi de dégradation biologique qui les conduit à la simplification minérale, préparatoire à l'évacuation définitive.

En résumé, la présence des lipoïdes dans le sang paraît avoir double origine, alimentaire et glandulaire. Les lipoïdes n'y sont pas seulement véhiculés jusqu'aux lieux d'utilisation organique. Ils servent à d'autres fins immédiates *in loco*. On leur a, notamment, attribué des actions antihémolytiques. De la vertu élective que leur accorde Overton vis-à-vis des narcotiques, ne pourrait-on même expliquer les différences individuelles que l'on rencontre à la résistance relative de certains sujets à la narcose?

De ce que les lipoïdes se trouvent en quantité notable chez tous les êtres vivants, répartis sous des teneurs appréciables dans tous les organes et surtout prenant part à la constitution des plus importants d'entre eux; de ce que ces composés sont en abondance, notamment au niveau des éléments jeunes de nouvelle formation, des éléments capables d'assurer la repro-

5) Mulon. *Comptes rendus de la Société de Biologie* 1903, vol. LV, p. 82. *Presse médicale*, 1903, p. 92.

duction, il est de bon sens d'en conclure, *à priori*, au rôle capital joué par ces composés dans l'évolution des êtres. Les jeunes pousses, les semences, le jaune des œufs des oiseaux, la laitance des poissons, les spermatozoïdes, le sang, les hématies, la moelle des os, le système nerveux, en contiennent des proportions variables, mais toujours très notables.

Les analyses comparées du jaune de l'œuf de poule à différents stades de son incubation, montrent que la proportion de la lécithine décroît avec l'âge. D'une manière générale, cette substance est plus richement répandue chez les jeunes. De cela, on serait déjà en droit de conclure à sa participation dans la croissance des plantes et des animaux.

Les expériences ont confirmé cette manière de voir. Danilewski, le premier, montra expérimentalement toute l'influence de la lécithine sur la multiplication cellulaire, sur l'augmentation du taux de l'hémoglobine et du nombre des globules rouges du sang, sur la croissance et le poids des animaux en expérience. Desgrez et Zaki, dans une série de travaux remarquables, ont confirmé les données de leur prédécesseur, ont prouvé, en outre, combien la lécithine était un excitant énergique de la nutrition : leur détermination d'urée, d'azote uri-naire total et du coefficient d'utilisation azotée leur ont montré que les valeurs comparatives chez les animaux en expérience et les témoins, sont toujours en faveur des premiers.

A son tour, le professeur Carrière a pu noter d'une manière nette l'influence favorable exercée par la lécithine sur la croissance des enfants normaux et d'une manière plus générale sur la nutrition. L'hémolécithine devait donc tout spécialement attirer l'attention des chercheurs. Et il est bien présumable que le sang est un vecteur de lécithine contribuant par là à la croissance des jeunes, à la constitution des cellules nerveuses, à la formation du squelette. Son rôle assurément est encore plus large. L'équilibre nutritif lui demande encore autre chose : nous avons cité, en particulier, son action dans la défense globulaire qu'elle partage avec la cholesterine; enfin de récents travaux veulent bien lui accorder une prééminence dans la synergie endocrinienne.

De l'ensemble de ces considérations, il semble bien établi que le rôle des lécithines en biologie générale est particulièrement remarquable.

Quoique de connaissance chimique plus ancienne, les cholestérines ont été encore peu étudiées au point de vue de leur rôle biologique. On les a même considérées d'abord comme constituant des déchets de la nutrition.

Dans ces derniers temps, on est arrivé à des conceptions absolument contraires. Tout comme pour les lécithines, on aurait pu se douter un peu de l'activité des cholestérines au sein des économies animale et végétale. Les cholestérines sont disséminées partout dans les organismes, accompagnant le plus souvent les lécithines. Les semences, les jaunes d'œufs, le cerveau, le sang, tous organes d'activité physiologique considérable, en contiennent des proportions qu'on ne pouvait tenir pour négligeables et susceptibles d'être comparées à des déchets organiques, surtout étant donné leur siège d'élection.

Les expériences touchant le rôle des cholestérines sont moins nombreuses parce que plus récentes, mais ce rôle n'en a pas moins été mis en lumière, indirectement si l'on veut, par son étude des divers états morbides où il est apparu, au moins comme symptômatique. Tandis que les lécithines firent principalement l'objet d'études physiologiques et partant de là d'applications thérapeutiques, les cholestérines furent étudiées, en premier lieu, dans le domaine pathologique où elles se montrèrent au-delà ou en-deçà de certaines limites normales, comme évoluant parallèlement à un grand nombre de processus morbides (*). Les noms de Chauffard, Guy Laroche et Grigaut, Widal, André Weil et Laudat sont attachés à ces recherches du plus vif intérêt.

Une question dont l'importance est loin d'être secondaire est celle de l'apparition et de la formation de la cholestérine au sein de l'organisme animal. On peut comparer la cholestérine, sous ce rapport, à la lécithine et aux matières grasses en général.

Sans être autorisé à identifier les mécanismes, ces substances tirent leurs origines de deux sources : des mutations intracellulaires et des aliments.

Pour fixer les idées d'après quelques travaux touchant la

(*) Pour être complet, nous devons signaler que les cholestérines ne paraissent pas non plus physiologiquement inactives. Leurs actions antihémolytique et antitoxique seraient à elles seules les témoins du contraire.

cholestérine, citons : « l'Hypercholestérinémie d'origine alimentaire chez le chien », par A. Grigaut et A. L'Huillier (6), travail où est prouvée une corrélation entre l'augmentation de la cholestérine sérique et l'enrichissement voulu des aliments en ce même lipoïde; « Variation du taux de la cholestérinémie par rapport à l'alimentation », par Lemoine et Gérard (7), avec des conclusions analogues touchant aussi les matières grasses en général; « L'Hypercholestérinémie d'origine surrénale », par Jean Troisier et A. Grigaut (8); « Fonction cholestérinigénique du corps jaune », par Chauffard, Guy Laroche et A. Grigaut (9), recherches affirmatives sur l'endocrinocholestérinigénèse. Divers auteurs, tel Mulon, déjà cité (10), ont affirmé la secrétion interne d'autres lipoïdes, de la lécithine en particulier, dont l'origine alimentaire paraît également prouvée.

Gottschau, Alezais et Guieysse, Albrecht et Weltmann (11), ont écrit sur les processus endocrigènes.

Pribam (12), Dorée et Gardner (13), Ellis et Gardner (14), Fraser et Gardner (15), Klein (16), Grigaut (17), ont démontré l'influence alimentaire.

(6) A. Grigaut et A. L'Huillier. *Hypercholestérinémie d'origine alimentaire chez le chien.* — Soc. de Biol., 27 juillet 1912.

(7) Lemoine et Gérard. Soc. Méd. des Hôpitaux de Paris, 22 juin 1912.

(8) Jean Troisier et Grigaut. *Presse Méd.*, 28 décembre 1912.

(9) Chauffard, Guy Laroche et Grigaut. *Fonction cholestérinigénique du corps jaune.* — Soc. de Biol. Preuves histologiques, 16 février 1912; Preuves chimiques 17 février 1912; *l'Obstétrique*, mai 1912.

(10) Mulon. — *Loc. cit.* page 12.

(11) Albrecht et Weltmann. — *Uber das Lipoïd der Nebennierende*, Wien. Kli. Woch. 1911, *14*, 483.

(12) Pribam (Hugo). — *Beitrag zur Kenntnis des Schichsals des Cholesterins, und der Cholesterinester im tierischen Organismus.* — Bioch. Zeitsch. I, 1906.

(13) Dorée et Gardner. — *The originin and destiny of Cholestérol in Animal Organism. Proceding of the Royal Society B.* — Part. II. *The excretion of Cholesterol by the dog*, 1908, *80*, 227-239. — Part. III. *The absorption of Cholesterol from the Food and its appearance in the Blood*, 1909, *81*, 109-128.

(14) Ellis et Gardner. — Part. VI. *The excretion of Cholesterol, by the cat*, 1909, *81*, 505-515.

(15) Mary Fraser et Gardner. — Part. V. *On the Inhibitory action of the Sera of Rabbits fed on Diets containing Varying Amounts of Cholesterol on the Hoemolysis, of Blood by Saponin*, 1909, *81*, 230-247.

Part. VII. *On the quantity of Cholesterol and Cholesterol Esters in the Blood of Rabbits fed on Diets containing Varying Amounts of Cholesterol*, 1910, *82*, 559-568.

(16) Klein. — *Uber die Resorption von Cholesterin und von Cholesterinestern.* Biosch. Zeitsch. 1910, 29.

(17) H. Grigaut. — *Taux de la cholestérinémie des herbivores et des rongeurs.* Soc. de Biologie, 2 juillet 1911.

Nous ne pouvons ici que signaler ces travaux auxquels nous renvoyons le lecteur.

§ 6. — Ce que nous entendons par liposes, lipoïnes et acides lipoïques.

Les matières grasses du sang s'y rencontrent probablement sous les variétés les plus diverses et, sans doute, en nombre comparable à celui où elles figurent dans les autres tissus.

Il semble qu'il y ait, actuellement, une tendance à généraliser encore la signification des mots : matières grasses ou corps gras et couvrir de leur étiquette même les substances cataloguées sous le nom de lipoïdes. Ne serait-il pas plus simple de maintenir cette appellation de *matières grasses* dans sa signification originelle, c'est-à-dire significative des graisses et des huiles naturelles, mélanges complexes de glycérides dans lesquels dominent presque uniquement les acides gras fixes à poids moléculaires élevés?

Ces éthers de la glycérine sont des éthers neutres, des *triglycérides*. Et, en conséquence, les principes immédiats constitutifs des graisses et des huiles animales ou végétales, doivent naturellement porter ce nom, conforme à la nomenclature chimique. Mais ce terme s'applique également à une foule d'autres éthers de la glycérine, rencontrés peu ou même pas du tout dans les corps gras naturels et qui sont surtout des éthers de synthèse créés dans le laboratoire.

Par conséquent, dans le but de simplifier et de préciser le langage, chaque fois qu'il s'agirait des triglycérides naturels, nous pensons qu'il y aurait intérêt à les désigner d'un mot rappelant à la fois leur origine et leur nature. Au cours de l'étude présente, nous appellerons donc *lipoïnes* ces éthers gras neutres de la glycérine, parties constituantes des corps gras naturels. Ce terme s'adapte, en outre, à la nomenclature habituelle et nous nous y conformerons encore en désignant sous le nom d'*acides lipoïques* les acides gras rentrant dans la constitution des *lipoïnes*, c'est-à-dire tout particulièrement les acides stéarique, palmitique ou oléique.

Remarquons enfin que le mot *lipoïnes* fait encore, en quelque sorte, parallèle au mot *lipoïdes* qui désigne, lui aussi.

des principes définis extraits des corps gras naturels, et que le second dérive heureusement du premier par sa physionomie, sa consonnance, par les idées qui s'y rattachent au point de vue biochimique. Nous pensons apporter encore de la clarté et de la simplicité en désignant d'un autre nom particulier l'ensemble des *lipoïnes* et des *lipoïdes*. Nous adoptons celui de *liposes*, évocateur, dans notre intention, de la totalité des *principes immédiats gras* composant les matières grasses, ce dernier nom, nous le répétons, étant réservé aux huiles ou graisses extraites des organismes et dont la composition complexe peut comporter même des substances azotées et minérales.

Les matières grasses jusqu'ici mises en évidence dans le sang d'une manière non douteuse sont des triglycérides, ou plus précisément des *lipoïnes* formées aux dépens des acides stéarique, palmitique et oléique. Il n'est pas prouvé qu'il soit permis d'exclure les autres acides gras de la même famille. Les auteurs s'accordent encore sur l'existence certaine d'acides gras libres, mais en quantité plus faible. Parmi ces acides figurent des corps de condensation en C inférieure à C^{10}. Ils sont volatils et distillent sans décomposition sous la pression ordinaire. On a noté aussi des acides gras combinés aux alcalis. Enfin il ne faut pas oublier la glycérine libre.

Parmi les *lipoïdes*, il y a des phosphatides dans la masse sanguine. On les traduit, nous l'avons vu, sous la forme de *lécithine distéarocholinique*, mais en vertu d'une simple hypothèse. En revanche, la cholestérine ordinaire, libre ou combinée, rentre dans la catégorie des faits démontrés. Quant aux *lipochromes*, ils doivent leur nom à leur pouvoir d'imprégner les graisses et à la difficulté qu'on éprouve à les en séparer, à cause de leur solubilité dans les solvants ordinaires des corps gras. Leur nature chimique ne paraît pas les en rapprocher : la *bilirubine* du sérum, par exemple, peut être considérée comme un *lipochrome*, uniquement parce qu'elle s'attache avec ténacité aux matières grasses dans les diverses manipulations qu'on leur fait subir pour les extraire.

§. 7. — But que nous nous proposons d'atteindre.

Notre but est d'exposer les travaux relatifs aux matières grasses du sang. Nous remonterons aussi loin dans l'Histoire qu'il nous sera possible de le faire. De cette manière, nous assisterons à l'éclosion des découvertes successives, nous mettrons sous les yeux du lecteur les procédés qui ont présidé à la mise en évidence des diverses variétés des matières grasses et nous décrirons les méthodes qui ont permis plus tard de les doser. Nous terminerons enfin par la description détaillée de notre propre méthode de dosage.

A celle-ci, nous réserverons une étude de genèse et de technique particulièrement attentive, car pour se permettre de prétendre à la comparaison avec ses voisines et ses anciennes, elle se doit de prouver auparavant qu'elle en est digne.

Ce faisant nous nous maintiendrons dans le domaine des faits qui, jusqu'ici, paraissent prouvés, au moins en ce qui concerne les principes que nous nous sommes proposé d'évaluer numériquement. Mais à l'occasion nous ne négligerons pas de formuler des hypothèses basées sur les résultats de nos expériences. Loin de nous la pensée de viser un objet différent de celui qui est habituellement recherché par les méthodes de dosage consacrées. Nous voulons aboutir à un but identique avec des moyens différents, quelquefois avantageux ; en un mot, nous voulons décrire une méthode nouvelle. Présenterait-elle ce seul titre qu'elle ne serait pas sans intérêt aux regards de la Chimie pure. Nous pensons qu'au point de vue pratique elle offre encore des particularités qui, jointes à la considération précédente, nous ont engagé à la faire connaître. En raison de ses caractéristiques, nous la désignons sous le nom de *méthode acétone-savons d'argent*.

Au début de 1912 et à l'instigation de M. le professeur agrégé Castaigne, nous nous sommes livré à de nombreuses analyses de sang provenant de malades atteints d'affections diverses : néphrites aiguës et chroniques, cirrhoses, syphilis,

tuberculose pulmonaire, autres affections pulmonaires, etc. Dans le sang total et le sérum de ces divers malades, nous avons dosé l'urée (méthode Desgrez), le rapport azotémique, la résistance globulaire (procédé Hayem), la bilirubine (Gilbert et Herscher), enfin la cholestérine par les méthodes de Grigaut, de Grimbert et Laudat: la lécithine et les acides gras au moyen de la technique de ces derniers. Nous avons été amené, ensuite, à rechercher une méthode assez générale capable de nous conduire avec les quantités réduites de sang humain dont nous disposions, — nous verrons comment à propos de la genèse de notre méthode, — au dosage de tous les constituants principaux du sang, puis nous avons concentré nos efforts sur la détermination des matières grasses, nous attachant à préciser notre technique sur ce point particulier, d'où est sortie notre méthode de dosage.

Nous décrirons en leur temps ces recherches spéciales. Elles ont pour objet précis le dosage des *acides lipoïques* totaux, de la *cholestérine* totale, de la *lécithine distéarocholinique*.

On ne connaît aucun moyen d'extraire du sang, d'un coup, les *liposes* pures et rien qu'elles. On est arrivé cependant à les extraire en totalité, mais toujours mélangées d'une forte proportion d'impuretés. Il faut ensuite, soit les quantifier indirectement, soit les isoler à l'état de pureté. Notre programme demeure le même. Nous aurons à examiner en premier lieu l'extraction, ensuite le dosage proprement dit, indirect (lécithine) ou direct sur les substances pures (acides lipoïques, cholestérine).

Mais avant d'entreprendre l'exposé de notre méthode, nous présenterons les travaux de nos devanciers avec les origines de leurs découvertes, leurs déterminations qualitatives et quantitatives et l'examen critique des méthodes employées, y compris celles des expérimentateurs contemporains.

Cela fera l'objet d'un Historique que nous diviserons en trois périodes : ancienne, moderne et contemporaine.

CHAPITRE II

QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR L'ANALYSE ET LA COMPOSITION GÉNÉRALE DU SANG DEPUIS LES ÉPOQUES DE DÉBUT JUSQU'AU SEUIL DE L'ÉPOQUE CONTEMPORAINE

La présence des matières grasses dans le sang échappe complètement aux premiers observateurs qui s'occupent de la composition chimique de cet élément essentiel des organismes de l'échelle zoologique supérieure. La Science était déjà forte de faits nombreux et assez précis quand elle vit éclore les premières tentatives ayant pour objet la recherche et la caractérisation des *hémoliposes*.

C'est pourquoi nous croyons devoir tracer une esquisse, d'ailleurs rapide, de l'évolution et de l'état des connaissances humaines relatives à la composition du sang depuis les origines jusqu'au moment où nous verrons y apparaître et s'y incruster les premières racines de l'arbre lipohématologique dont nous suivrons ensuite, pour lui seul, le développement tout entier.

Nos propres réflexions seront imprimées en petits caractères, afin que le lecteur puisse les distinguer à première vue de celles des auteurs que nous reproduirons.

Les premiers essais chimiques relatifs au sang remontent au XVII^e^ siècle. Barbatus, Bohnius, Wieussens, Rhadès, Vestrub, Menziez, se livrent à des opérations élémentaires et peuvent être considérés comme des précurseurs.

Leuwenhoeck, Nicolas Lémery (1645-1715), Albert de Haller (1708-1777), de Haen, incinèrent le sang et déterminent dans les cendres des matières salines et du fer.

Le *Dictionnaire des Arts et des Sciences* de l'Académie française, nouvelle édition revue par *** de l'Académie royale des Sciences, datée de 1732, nous fournit à l'article « Sang » une description copieuse de la circulation de ce fluide d'après Harvey (1578-1658) et une appréciation de sa composition chimique au moins étonnante, même pour l'époque, si l'on n'admet pas que l'auteur ait voulu faire allusion à l'origine sanguine de l'urine : le sang serait, en effet, formé d'une *matière urineuse* et d'une matière saline.

On lit dans l'*Encyclopédie* de Diderot, datant de 1765, et dans son supplément de 1777, qu'il y a dans le sérum une matière albumeuse, qu'il est précipité par la chaleur, les acides, l'esprit de vin. Quand le sang vient d'être répandu, il exhalerait une certaine *vapeur* et par distillation il fournirait une huile s'épaississant à mesure que l'opération est poussée plus loin et se condensant sur les parois du ballon. Cette huile n'existerait pas réellement dans le sang; elle se formerait par sa décomposition sous l'influence de la chaleur. Finalement il reste un charbon. Le caillot serait composé de globules rouges et d'une matière fibreuse et la coagulation elle-même serait due à des causes que nous trouverons décrites par Hunter dans son ouvrage de la même époque.

Dès le moment où l'homme fut capable de la plus élémentaire observation, son attention a dû être attirée par cette propriété du sang de se partager en deux portions, faciles à distinguer, peu après sa sortie des vaisseaux. Nous n'avons que peu de renseignements sur les idées des anciens à cet égard. Il faut remonter au XVIII^e siècle pour rencontrer des chercheurs avides d'interpréter ce singulier phénomène.

Le chirurgien anglais John Hunter (18) l'étudie minutieusement dans son *Traité sur le sang*. On lit dans cet ouvrage, d'où nous extraierons aussi, un peu plus tard, une discussion embryonnaire sur la lipémie : « La coagulation n'appartient » pas à la maffe entière du sang, mais à cette partie que j'ai » appelée « lymphe coagulante », laquelle durant cette action » fe détache de la partie féreufe ».

Le sang ne se coagule pas sous l'effet de son refroidisse-

(18) John Hunter. *Traité sur le sang, l'inflammation et les playes d'armes à feu.* Traduit par J. Dubar.

ment. Hunter a vu du sang de poisson se coaguler à une température supérieure à celle du corps de l'animal. Au contraire, ajoute-t-il, la chaleur est favorisante.

L'air n'intervient pas non plus. Le repos aurait plus d'influence; toutefois il y a d'autres causes. Le sang dans les vaisseaux a moins de tendance à se coaguler. La coagulation a lieu parce que le sang est hors des vaisseaux et privé de mouvement.

Tout cela est bien observé, mais nous sommes encore loin des théories modernes.

Naturellement les globules rouges étaient bien connus de Hunter. Il a également observé le phénomène de l'hémolyse. Il dit en effet : « L'eau ajoutée au sang dissout les globules rouges ».

C'est aller un peu loin comme appréciation, mais c'est bien le phénomène apparent.

Hunter observe aussi le sang veineux en présence de l'air : » Je remplis à demi une phiole de fang veineux foncé et je » fecouai ce fang avec l'air qui s'y mêla et il devient auffitôt » d'un rouge vif ». Cette expérience, faite en 1755, bien avant Lavoisier, ne semble pas cependant entraîner la conviction de Hunter, relativement à l'action chimique de l'air. Il paraît croire, en effet, que les variations de couleur tiennent au plus ou moins de mouvement du sang. L'air n'aurait qu'une influence mécanique. Lavoisier, comme on sait, a mis en évidence sa véritable action.

Hunter interroge aussi le sérum. L'intensité de sa coloration jaunâtre est variable. Cela est dû aux substances dissoutes. Il est composé d'une partie coagulable par certaines mixtures. Cette partie semble être de même nature que le *blanc d'œuf*.

Cette assertion remarquable est un premier pas vers l'identification de ce coagulum avec une matière albuminoïde. Auparavant on pensait que le principe qui donne au sang sa consistance, son aspect, quelques-unes de ses propriétés les plus apparentes, était la *gélatine*, à laquelle on a substitué la notion d'*albumine*.

A l'époque de Hunter, on utilise déjà les procédés modernes

pour scinder le sang ou le sérum en coagula et coagulum : Hunter coagule le sérum avec la chaleur. Le phénomène a lieu, observe-t-il, entre 160 et 165° Fahrenheit. L'esprit de vin, à quantité égale, les esprits volatils employés, en quantité supérieure à celle du sérum coagulent celui-ci. Comme on voit, l'application de l'alcool à ce cas particulier n'est pas de date récente.

Hunter en arrive enfin, dans son ouvrage, à considérer le sang comme composé de quatre parties : une lymphe coagulante d'où dérive la coagulation spontanée du sang, des globules rouges et un sérum formé de deux parties dont une coagulante.

De 1773 à 1776, Rouelle le Jeune (1703-1770 et Bucquet font des observations semblables. Rouelle prétend que la portion liquide après coagulation du sang contient une matière coagulable comme *l'albumine de l'œuf*. Il y reconnaît la présence des muriates (chlorures) de soude et de potasse et du carbonate de soude. La portion solide ou coagulum est formée d'une matière colorante et une fibreuse, faisant ainsi allusion à la fibrine actuelle.

Bucquet affirme des analogies entre la matière colorante (caillot) du sang entier et du sérum. C'est évidemment vrai s'il fait allusion à la nature protéique des deux parties. Il reconnaît la présence du fer et mentionne la faiblesse du sérum en cet élément.

De nos jours, on constate des traces de fer dans le sérum. Elles pourraient s'expliquer par une quantité très faible d'hémoglobine diffusée. C'est l'opinion de Hayem. Bien entendu, au XVIII[e] siècle, le fer n'était pas identifié sous sa forme organique, mais les hommes de cette période de l'Histoire, incinèrent, comme les contemporains, les substances organisées et organiques, les réduisent en cendres, dans lesquelles ils recherchent les métaux.

Les procédés du feu les plus simples : grillage, incinération, distillation, devaient naturellement précéder les autres dans l'étude chimique des substances issues des règnes animaux et végétaux.

Dans ses *Eléments d'histoire naturelle et de chimie* Fourcroy (1755-1809) (19) le rappelle expressément : « L'ana-

(19) *Loc. cit.* p. 8

» lyse des substances animales est la partie de la chimie la » plus difficile et la moins avancée ; les chimistes anciens se » sont contentés de distiller à feu nu ces matières et l'on » sait aujourd'hui que cette opération altère et dénature » entièrement les corps aussi composés que le sont les subs- » tances solides ou fluides des animaux ».

Aujourd'hui, nous pouvons aller plus loin encore. Nous connaissons les effets funestes de la chaleur, même modérée. Quand nous élevons la température, c'est en toute connaissance de cause. Nous agissons le thermomètre sous les yeux, en sachant qu'au-dessous de tel degré la substance étudiée demeure inaltérée. Nous avons une tendance de plus en plus marquée à faire nos séparations et nos dosages à froid. Dans l'action du vide nous trouvons souvent un auxiliaire précieux.

Voici un résumé de la méthode d'investigation du sang par Fourcroy. C'est aussi celle de ses contemporains et de ses devanciers immédiats. Nous ne pouvons encore lui décerner le nom d'*analyse* :

Ils traitent successivement le sang entier, le caillot et le sérum :

1° En les distillant à feu nu, ce qui fournit un *phlegme* (distillat) susceptible d'une putréfaction rapide et un charbon volumineux difficile à incinérer parfaitement.

Fourcroy dit avoir caractérisé dans ces cendres (sang total) de l'*oxyde de fer* et une matière en apparence terreuse paraissant être du *phosphate calcaire.*

Pour le sérum, dont la *cendre*, très difficile à obtenir, exige une grande surface d'exposition à l'air, elle est d'un gris noirâtre et contient du muriate et carbonate de soude et du phosphate calcaire.

La difficulté de réduire en cendres complètement les tissus animaux reconnaît pour cause essentielle, comme nous ne l'ignorons pas actuellement, la présence du chlorure de sodium dont la fusibilité permet l'enrobement des particules charbonneuses. Nous obvions à cet inconvénient en grillant à la température la plus basse possible. Cette manière d'opérer offre deux avantages : elle écarte l'inconvénient précédent et évite des pertes en chlorures par volatilité. Si, malgré tout, le grillage reste incomplet, on termine par un lavage à l'eau et on recommence l'incinération sur le *filtratum*. On tient compte du *filtrat* dans les résultats de l'analyse.

2° Evaporation au bain-marie. Pour la première fois, nous voyons apparaître cet utile auxiliaire du chimiste.

Après distillation au bain-marie, le sérum se condense en une matière solide, d'apparence cornée, qui ne se dissout plus dans l'eau.

3° Le sérum et le sang entier sont précipitables par l'alcool, les acides, la chaleur.

Le sérum versé dans l'eau bouillante se coagule en grande partie et sur le champ. Fourcroy dit de lui qu'il est un *fluide albumineux* et l'assimile au blanc d'œuf, dont il partage, en effet, cette propriété. L'ammoniaque, au contraire, fluidifie les *coagula*. Nous savons, positivement, que c'est là l'effet de l'ammoniaque sur les albuminoïdes.

4° L'acide nitrique donne lieu à un dégagement d'*azote*.

L'auteur en conclut *qu'il y a de l'azote dans le sang*. Malgré l'exactitude de ce fait, cette déduction est faite pour surprendre de la part d'un esprit avisé comme celui de Fourcroy. Il eut été pour le moins prudent de faire des réserves. La nature de l'acide nitrique avait été déterminée en 1784 par Cavendish et l'azote découvert par Rutherford en 1772. Fourcroy ne pouvait ignorer que cet acide était azoté. Aujourd'hui, une prudence encore plus grande s'imposerait en telle occurence, car nous connaissons la facile réductibilité de l'acide nitrique.

5° D'autre part, l'auteur note que la distillation du sang donne naissance à des produits ammoniacaux (carbonate d'ammoniaque) de même que sa putréfaction.

C'était ici la place de l'affirmation précédente, Berthollet, en 1785, ayant établi la composition du gaz ammoniac appelé à cette époque *gaz alcalin*.

6° Le caillot lavé est privé de sa couleur rouge. Il reste une *substance fibreuse blanche*. La fibrine nous apparaît ici nettement isolée.

Quant à la couleur du sang ou du caillot, Fourcroy l'attribue à la présence du fer. « En résumé, dit-il, le sérum paraît être un *mucilage animal* composé d'eau, de *bases huileuses acidifiables*, de muriate et de carbonate de soude, de phosphate calcaire. »

L'imprécision des termes employés révèle assurément le vague qui régnait encore dans les idées relatives à la composition du sang sur le déclin du XVIII[e] siècle.

Au début du XIX[e], Berzélius (1779-1848) (20) regarde le sang « comme un liquide qui contient une matière colorante suspendue et non dissoute ». D'après lui, le caillot serait constitué par la fibrine et la substance colorante. Celle-ci ne tirerait pas sa couleur du sous-phosphate de fer comme le pensaient Fourcroy et Vauquelin. C'est une combinaison de fer particulière *organique*.

Berzélius pense aussi qu'il faut attribuer au fer les changements de couleur du sang : la matière colorante absorbe l'oxygène et le sang veineux devient artériel. C'est là une opinion renouvelée de Lavoisier.

Thénard exprime un avis analogue et la couleur du sang est due également, d'après lui, à une matière animale.

En ce qui concerne le sérum, Berzélius en donne l'analyse suivante :

Eau		905,0
Albumine		80,0
Substances solubles dans l'alcool	Muriate de potasse et de soude . . . . . 6 Lactate de soude uni à une matière animale . . . 4	10,0
Substances solubles dans l'eau	Soude, phosphate de soude et un peu de matière animale.	4,0
	Total	999,0

Dans cette nomenclature, citée ici, pour donner une idée des analyses de l'époque, il n'est fait, comme on voit, aucune mention de substances grasses. Il n'y a pas lieu de s'en étonner, puisque c'est à peine si des allusions qualitatives, au surplus assez indécises, sont notées dans l'œuvre de Berzélius comme dans celles de ses contemporains.

Les déterminations quantitatives ne s'adressent en général qu'aux substances nettement définies. A l'époque de Berzélius, le sang apparaissait comme formé d'un liquide tenant en suspension une matière susceptible de s'en séparer en donnant naissance aux phénomènes de la coagulation. Le caillot était formé d'un corps

(20) Jean-Jacques Berzélius. *Sur la composition des fluides animaux : sang de beuf, sang humain.* (*Annales de chimie*, 31 octobre, 1813, t. 88.)

contenant du fer à l'état organique, fer auquel il devait sa couleur et sa capacité de fixer l'oxygène. Le liquide restant, ou sérum, était composé d'albumine, tenant en solution des matières salines et une matière albumineuse précipitable par la chaleur, les acides et l'alcool. Quant à la fibrine, il était admis qu'elle préexistait à la coagulation et qu'elle se solidifiait en participant à la formation du caillot.

C'est aussi l'opinion soutenue par Denis (21) qui s'exprime ainsi : « J'ai admis le premier (1828) que la fibrine est » liquide dans le sang qui circule et qu'elle ne se solidifie » qu'au moment de la solidification, conséquemment, que ce » dernier phénomène est le simple résultat de la solidité qu'elle » prend alors. »

Avec Prévost et Dumas (1821) l'analyse quantitative se précise, mais les matières grasses sont toujours négligées. Ces auteurs dosent la fibrine, l'albumine, les globules rouges, les sels, par une méthode qui fut presque seule employée pendant près de 40 ans, jusqu'aux travaux ultérieurs de Denis.

Dans les années suivantes, la matière jaune du sérum est étudiée par Denis, Lassaigne, Braconnot, Sanson et Lecanu, qui la rapprochent de la substance jaune des ictériques et doutent même qu'elle ne lui soit différente.

Au surplus, cette opinion est fort ancienne, puisqu'au XVIII^e^ siècle on pensait que la bile existait dans le sang.

Il faut arriver à Lecanu (22) pour trouver une détermination pondérale des matières grasses, ainsi que nous le verrons.

Pour ce qui est de l'*urée*, Lecanu nie sa présence. Il se base sur l'expérience suivante : Traitant le sérum par l'alcool, il évapore ce dernier et reprend le résidu par l'eau, qu'il fait disparaître à son tour au bain-marie. Le résidu, qui exhale une odeur d'urine, dit-il, est repris par l'éther, chassé à son tour jusqu'à consistance de sirop. Ce dernier, refroidi, est mélangé avec son volume d'acide azotique concentré. Dans ces conditions, il n'obtient pas de traces de nitrate d'urée.

(21) *Loc. cit.* p. 2.

(22) LECANU. *Nouvelles recherches sur le sang.* (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, sept. 1831, p. 485).

Mais Dumas et Prévost, en enlevant leurs reins aux animaux et accumulant, de cette manière, l'urée dans leur sang, y ont démontré la présence de ce corps.

C'est sans doute à la suite de cette expérience qu'on entreprit de doser l'urée, dans le mal de Bright.

Au milieu du XIX^e^ siècle, on considère avec Figuier (23) que les globules sont formés d'hématosine, d'albumine et d'un peu de fibrine. Pour séparer et laver les globules, on emploie couramment l'observation de Berzélius d'après laquelle une solution d'un sel neutre (sulfate de soude, chlorure de sodium ou même de l'eau sucrée), ajoutée à du sang défibriné, permet de retenir sur le filtre la plus grande partie des globules.

On continue à évaluer l'eau par évaporation à chaud, bien que, comme le disait déjà Denis en 1838 « ce procédé par » dessiccation est vicieux ; alors le sang perd de sa substance » et s'altère. Il faut opérer par le vide sec, comme l'a proposé » M. Chevreul ».

Ce même Denis découvre plus tard la *sérum globuline* et propose l'emploi du sulfate de magnésie pour en opérer l'isolement. On trouve les détails de sa méthode d'analyse dans son « *Mémoire sur le sang*, de 1859 (24).

Nous arrêterons là cette description rapide des étapes par lesquelles ont passé successivement les études sur la chimie du sang, depuis le vague des époques anciennes jusqu'au seuil de l'époque contemporaine, qui a enrichi l'hématologie d'un si grand nombre de faits aussi précieux pour la Science pure que pour la Science appliquée et l'Art de guérir.

Nous allons maintenant revenir en arrière et reprendre l'étude détaillée du sang, mais au seul point de vue de ses matières grasses.

(23) Figuier. *Comptes R. de l'Ac. des Sciences*, 1844, t. 19.

(24) Denis. *Mémoire sur le sang considéré quand il est fluide, pendant qu'il se coagule, lorsqu'il est coagulé, suivi d'une Notice sur l'application de la méthode d'expérimentation par les sels à l'étude des substances albuminoïdes.* Mémoire présenté à l'Acad. des Sciences, le 20 décembre 1858.

PREMIÈRE PARTIE

Les matières grasses du sang.

Historique. — Méthodes d'analyses. Réflexions suggérées.

Nous ne nous contenterons pas d'une exposition sèche des recherches et des méthodes. Elles seront, au contraire, examinées à la lumière de la Science contemporaine et suivies ou encadrées d'analyses critiques et des reflexions qui nous seront suggérées d'après les connaissances actuelles.

Or, de ces connaissances, nos prédécesseurs n'en sont-ils pas les artisans? En nous cédant cet héritage colossal, ils nous ont rendu aisée la tâche d'apprécier leurs travaux et il serait singulier de combattre ces ouvriers de la première heure au moyen des propres armes qu'ils ont forgées à notre usage. C'est donc en toute humilité et avec grande admiration que nous entreprendrons de disserter sur les monuments scientifiques légués par leur génie créateur.

CHAPITRE I

PÉRIODE ANCIENNE

En 1668, Marcello Malpighi (1628-1694), signale dans les vaisseaux sanguins de l'épiploon, des globules, qu'il crut des globules de graisse : ils n'étaient pourtant que les hématies elles-mêmes. Cette erreur n'a fait bénéficier l'anatomiste et médecin italien ni de la découverte des matières grasses dans le sang, ni même de la découverte des globules rouges humains, assurée sans conteste à Antoine Van Leuwenhoeck (25) qui les découvrit le 15 août 1673, le hollandais Jean Swammerdam (1637-1689), de son côté, ayant antérieurement (1658) mis en évidence ceux de la grenouille.

John Hunter. — Il faut franchir une longue période et arriver au XVIII[e] siècle où parait l'important *Traité sur le sang*, de John Hunter, déjà cité (26), pour constater, de la part de cet auteur, une préoccupation spéciale à l'égard des graisses. Le sérum, observe-t-il, est quelquefois un peu trouble, notamment chez les femmes enceintes, mais aussi chez des hommes et d'autres femmes. « Hewson (" On the Blood ") a cru que c'était de la graiffe ou de l'huile abforbée, ce qui certainement n'est pas. » Et le chirurgien anglais, après avoir saigné des parturientes dans un but thérapeutique — opération très fréquente à son époque, — remarque souvent leur sérum *blanc* avec une *pellicule* surnageante, laquelle paraît globulaire au microscope. Cette substance, note-t-il encore, surnage

(25) LEUWENHOECK. *Physiologie d'Haller*, vol. II, lib. V.
(26) Voir page 21.

l'eau sans s'y mêler, au contraire des globules rouges *qui s'y dissolvent.*

Il s'agit évidemment des sérums connus, aujourd'hui, sous les noms d'*opalescents*, de *lactescents*. Sur la nature de cette opacité relative du sérum, on est actuellement à peu près nettement fixé. F. Widal et Sicard (27), A. Jousset (28), A. Javal (29), Widal, André Weil et Laudat (30), considèrent la lactescence ou l'opalescence comme très probablement déterminée par des graisses et l'état physique de ces graisses.

Cette apparence du sérum n'est pas liée à un accroissement de sa teneur en substances grasses. Il y a des sérums richement dotés sous ce rapport, et transparents. Il en est de pauvres, relativement, et troubles. Comme les auteurs précédents, nous avons fait de semblables constatations. La dernière proposition est néanmoins plus rare et pour Widal, André Weil et Laudat, chez les brightiques, tout sérum lactescent est lipémique.

En résumé, le phénomène tire, sans doute, son origine, moins de la quantité que de la qualité des graisses en présence et de leurs proportions relatives, par conséquent de leur dissolution plus ou moins favorisée par les proportions de certains corps ou complexes de nature grasse ou même d'une autre nature. Il s'agit en somme d'un état d'équilibre déterminé par des dissolutions réciproques. Exemple : la cholestérine insoluble dans l'eau trouve un facteur de solubilité avec la présence des savons. Une portion reste émulsionnée si les savons sont insuffisants.

Quand Hunter signale la hardiesse des conclusions de son contemporain Hewson, on peut se demander s'il lui reproche de considérer le trouble de certains sérums comme étant le résultat de la présence des graisses. Nous ne le pensons pas. Il discute simplement l'origine de ces graisses et ne considère pas comme démontré — les mots « graiffe et abforbée » le prouvent — que le trouble d'un sérum soit attribuable à l'ingestion de graisses ou huiles

Cependant ce trouble, l'expérience en témoigne, s'il n'est pas une conséquence nécessaire de l'ingestion des graisses, en est souvent le résultat, au moins pour le sang de la veine porte, et dans tous les cas une alimentation riche en *lipoïnes* est une condition prédisposante.

(27) F. Widal et Sicard. *Opalescence et lactescence du sérum de certains albuminuriques. Bulletin et Mémoire de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris*, 6 nov. 1896, et *Semaine Méd.* 1896, p. 456.

(28) Jousset. *Des humeurs opalescentes de l'organisme* (thèse 1901).

(29) A. Javal. *Lactescence du sérum et du liquide d'ascite dans un cas de néphrite syphilitique. Recherche et dosage des graisses produisant cette lactescence. Bull. et mémoire de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris* 23 oct. 1910, p. 847, et *Semaine Méd.* 1910, p. 612.

(30) Widal, André Weil et Laudat. *La lipémie des brightiques. Rapports de la rétinité des brightiques avec l'azotémie et la cholestérinémie.* (*Sem. Méd.*, 6 nov. 1912).

Hunter est simplement prudent quand il signale la hardiesse de son contemporain Hewson. L'hypothèse la plus probable est cependant qu'il s'agit bien de graisses ou de lipoïdes émulsionnés.

Hewson n'avait donc pas émis un jugement bien téméraire et on pourrait plutôt qualifier de tel, celui de son contradicteur. Encore aujourd'hui, d'ailleurs, le sujet est loin d'être épuisé et réclame des études nouvelles.

Quoi qu'il en soit, le chirurgien anglais, tout en contestant son origine alimentaire, ne nie pas la lipémie. Au contraire, c'est à lui et Schwilgué qu'on peut faire remonter les premières affirmations sur ce point. Ils furent même les premiers à présumer *in liquor sanguinis* l'existence d'une graisse analogue à celle des centres nerveux. Il existe, en effet, des lipoïdes communs au milieu sanguin et aux tissus nerveux.

Hunter admettait-il donc une formation purement interne? C'est probable.

Les contemporains ont fusionné les conceptions endogènes et exogènes. Le sang doit ses lipoïnes et lipoïdes au double jeu de la digestion et des échanges de la nutrition, au sens le plus général du mot : métabolisme, sécrétions endocrigènes. etc. Pour ce que nous avons dit de cette question, nous prions le lecteur de se reporter au paragraphe intitulé : « Origine et rôle des hémolipoïdes » de notre *Introduction*.

Parmentier et Deyeu. — En 1794, Parmentier et Deyeu (31) signalent une substance grasse volatile dont se chargent l'eau et l'alcool ajoutés au sérum et soumis ensuite à la distillation.

Cette observation ancienne n'est que l'expression de la plus stricte vérité. Nous avons pu nous-même nous en convaincre au cours de nos recherches. L'alcool distillé, même dans le vide, entraîne, surtout vers la fin, des acides gras votatils.

Berzélius. — Nous arrivons au Mémoire de Berzélius, paru en 1813 dans les *Annales de Chimie* (32) et intitulé : « Sur la composition des fluides animaux. » On y trouve une étude particulière du sang humain et du sang de bœuf. Dans ses conclusions, Berzélius ne fait aucune remarque relative à des principes gras. Il parle seulement d'une matière *adipocireuse* qui serait formée par l'action de l'alcool et des acides sur la fibrine. Elle ne préexisterait donc pas. Elle prendrait naissance sous l'action des réactifs.

(31) Parmentier et Deyeu. *Journ. de Phys. de Lam.* p. 384.
(32) Berzélius. *Loc. cit.* p. 26.

Chevreul. — Un peu plus tard, Marie-Eugène Chevreul (1786-1889) (33), fait justice de cette manière de voir. Il montre que ce corps gras, découvert par Berzélius, existe effectivement dans la fibrine. C'est un corps cristallisé, ni acide, ni basique, faisant émulsion avec l'eau, contenant du phosphore et donnant des produits ammoniacaux. Il l'assimile à la matière nacrée cérébrale, extraite du cerveau, sous le nom de *cérébrine*.

Il s'agissait évidemment d'impuretés de la fibrine étudiée, insuffisamment lavée, par exemple, et à laquelle pouvaient adhérer des hématies contenant effectivement des lipoïdes phosphorés et azotés. Denis a prétendu plus tard (1828) que la dite graisse était de la *cérébrine*.

Quoique inexacte, cette observation constituait néanmoins un pas important fait sur la voie de la connaissance des corps gras hématiques. Chevreul avait déjà publié ses premiers travaux sur les graisses, isolé la *margarine* en écailles solubles dans l'alcool (34), étudié les produits de leur dédoublement sous l'influence des alcalis, affirmé que les corps gras neutres naturels ne sont en réalité qu'un mélange de *principes immédiats* (1814). Il parvint aussi par des moyens chimiques, en montrant que la *substance cristallisée des calculs biliaires humains*, découverte par Conradi en 1775, demeurait réfractaire à toute tentative de *saponification*, à lui faire une place à part, ou mieux à l'éloigner des principes gras déjà connus. La cholestérine dès lors, — car il s'agit d'elle, — ne pouvait plus être confondue avec eux, et prenait figure de type chimique nouveau.

Avant Chevreul, les graisses et huiles avaient fait l'objet de travaux attentifs. On connaissait les savons, mais non le mécanisme de leur production. L'impuissance d'une classification chimique était suppléée, au début, par des *catégories* nées de l'observation brutale et grossière. Il y avait les graisses solides ou semi-solides de provenance animale et les huiles liquides d'origine végétale. Une classification basée sur une propriété physique précise, le point de fusion, fit place à l'ancienne. Plus tard, à la suite d'observations plus éclairées, aidées de l'expérimentation, on s'aperçut de l'hétérogénéité des graisses et des huiles. Des graisses, on put extraire des

(33) Marie-Eugène Chevreul. *Ann. du Muséum d'histoire naturelle*, 1823.
(34) Chevreul. *Comptes rendus Ac. des Sciences*, 5 juillet 1813.

huiles et inversement. Ainsi fut fait par Henri Braconnot où, dans son mémoire « Sur la nature des corps gras » (35), il s'explique sur ses procédés, dont le principe était de soumettre les corps gras à la pression et à l'absorption des parties liquides. Mais on peut dire avec Chevreul (36), qu'avant 1813, les corps gras étaient caractérisés par leur grande inflammabilité et une affinité pour l'eau extrêmement faible ou nulle ; leur capacité de produire, aussi, des savons ou des emplâtres, enfin leur fusibilité : huiles, beurres, graisses, suifs, cires.

Ce n'est pas, qu'avant Chevreul, les investigations chimiques aient fait défaut Elles manquaient d'une direction générale et, par cela, restaient isolées et infertiles. Elles accumulaient quelques faits sans cohésion les uns avec les autres. Ce fut une période d'obscurité relative et de tâtonnements, de germination quand même, où s'accusent, encore hésitantes, les premières lueurs d'une aube nouvelle, préparatoire à cette aurore éclatante, jaillie de l'œuvre capitale et définitive de Chevreul sur la constitution des corps gras (1823). Alors seulement, à la clarté de cette lumière nouvelle, il deviendra possible, dans tous les cas, de classer les principes gras, d'établir les analogies et les différences, et d'ouvrir aux découvertes à venir une orientation sûre, uniquement basée sur une méthode générale élémentaire.

Auparavant, nous l'avons énoncé, les examens d'ordre chimique furent fréquents aux mains de savants ingénieux et habiles. Berzélius (1807) avait enrichi la liste des corps gras d'une matière spéciale, blanche, phosphorée, extraite du cerveau, ensuite revue par Chevreul dans le sang (cérébrine).

L' « Analyse de la matière cérébrale de l'homme », par Vauquelin (37), fournit une preuve nouvelle de l'existence d'une combinaison grasse du phosphore.

Depuis ces découvertes anciennes, l'existence des graisses phosphorées n'a jamais été contestée. Elles ont fait l'objet d'innombrables travaux dont les résultats se contredisaient souvent. La lécithine du jaune d'œuf (Gobley 1845), nous apparaît une des premières comme une espèce chimique définie. La cérébrine, consacrée par

(35) Henri Braconnot. *Annales de chimie*, 31 janvier 1815.
(36) Chevreul. *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale*, 1889.
(37) Vauquelin. *Annales de chimie*, 31 janvier 1812.

tous les auteurs (Vauquelin, Couerbe, Chevreul, Lecanu, Denis), des trois premiers quarts du siècle dernier, comme graisse phosphorée, ne l'était en réalité qu'en vertu de la présence d'impuretés. Ces auteurs avaient analysé ce qu'on a appelé plus tard des *protagons*, substances complexes où figurent, non seulement du phosphore, mais encore du soufre. Ces protagons n'étaient que des mélanges, reconnus pour tels par Hoppe-Seyler et Diakonow, réhabilités ensuite par Gamgée, Blankenhorn et Baumstark et condamnés à nouveau, tout récemment, et exclus de la nomenclature des corps définis, sous l'influence en particulier de Thudicum.

La cérébrine ou plutôt ce qu'on appelle actuellement la *phrénosine* de Thudicum, est isolée des protagons par l'action des alcalis. Elle n'est pas phosphorée, elle reste seulement azotée et rentre dans la catégorie des *cérébro-galactosides* ou simplement *galactosides*, ainsi nommés parce que la baryte les dédouble en galactose, acides gras et base azotée.

Les graisses phosphorées définies appartiennent à une autre catégorie, également azotée d'ailleurs, celle des *phosphatides* hydrolisables en acide phosphorique (généralement acide glycérophosphorique), acides gras et base azotée.

Les protagons étaient des mélanges variables de phosphatides et galactosides encore compliqués parfois par la présence de substances soufrées. Dans ces conditions, on comprend la confusion qui a régné pendant si longtemps sur ces protagons, les divergences des auteurs à leur sujet, et combien on doit se féliciter de l'accord enfin intervenu, grâce aux travaux récents.

Comme nous l'avons expliqué au cours de notre *Introduction*, on doit donner le nom de *lipoïdes* à l'ensemble des *phosphatides* et *galactosides*, en y joignant, après Overton et O. Rosenheim, un troisième groupe dit *cholestérique* où figure, naturellement, la cholestérine ordinaire qui lui a donné son nom.

Dans son *Traité de chimie* (1829), Berzélius revient sur les graisses de la fibrine et y signale aussi des savons.

CHAPITRE II

PÉRIODE MODERNE

Lecanu. — Avec Lecanu, nous entrons dans une étude serrée du sang. De sa technique d'analyse générale, tirée de ses « Nouvelles recherches sur le sang », nous extrayons ce qui a rapport aux corps gras.

Ce mémoire, de 1831 (38), nous apprend qu'il précipite le fluide sanguin par l'alcool et lave le précipité avec le même liquide bouillant. Les alcools étant évaporés, le résidu est repris par l'éther, lequel donne une solution A et un nouveau résidu B.

A soumis à l'évaporation, abandonne un extrait brun rougeâtre que l'alcool froid dissout mal. On le lave à l'alcool froid et on le reprend par l'alcool bouillant. Celui-ci, refroidi, donne des lames blanches et nacrées qu'il ne faut pas confondre avec la *cholestérine*, dit Lecanu. La chaleur agissant sur le même extrait fournit des produits ammoniacaux et de l'acide phosphorique.

La présence de la lécithine et de l'urée suffiraient à expliquer ces résultats pyrogéniques.

La liqueur alcoolique jaunâtre, provenant des lavages, laisse après le départ de l'alcool un produit de saveur âcre et persistante, d'odeur fade, de consistance térébenthineuse.

Lecanu le regarde comme un principe immédiat, à tort à notre sens.

(38) *Loc. cit.* p. 27.

L'eau potassique le transforme en acide.

Lecanu veut dire évidemment qu'il y a formation d'un sel de potasse.

L'alcool froid à 40° agissant sur B donne lieu à un nouveau résidu C. Cette nouvelle solution alcoolique est distillée à son tour : on obtient un distillatum insoluble dans l'éther, soluble dans l'eau et l'alcool froid.

Nous avons affaire ici, sans nul doute, à des principes extractifs surtout azotés.

C soumis à l'action de l'alcool bouillant à 33°, isole enfin une nouvelle substance, soluble en majeure partie dans l'eau froide et composée, pouvons-nous avancer, de sels et très probablement de corps de nature protéique non touchés par la première précipitation alcoolique.

En somme, les résultats d'après Lecanu sont les suivants : une matière grasse cristallisée, une matière huileuse, des matières extractives solubles dans l'alcool et l'eau, un composé d'albumine et de soude, des sels solubles.

Cette classification rapproche des composés, parents par leur solubilité, mais n'isole et ne met en évidence aucun principe immédiat. Chaque groupe n'est en réalité qu'un mélange. Ce jugement ne veut pas atteindre le mérite de Lecanu, dont l'œuvre, par son ensemble, fut un gain sérieux en faveur des acquisitions ultérieures.

Les analyses de Lecanu sont les premières à donner les proportions des liposes. Nous les faisons figurer dans le tableau complet d'analyse d'un sérum humain, afin de donner l'idée qu'on se faisait, de son temps, sur la composition de ce liquide :

	1re ANALYSE	2e ANALYSE
Eau	906.00	901.00
Albumine	78.00	81.20
Matière organique soluble dans l'alcool et l'eau	1.69	2.05
Albumine combinée à la soude	2.10	2.55
Matière grasse cristallisable	1.20	2.10
Matière huileuse	1.00	1.30
Matière minérale	»	»
Perte	1.00	1.61
	1000.00	1000.00

Lecanu examine aussi le sérum en le desséchant préalablement.

Nous savons aujourd'hui qu'un tel procédé doit être condamné, en particulier quand il s'agit de l'extraction ou du dosage des liposes.

C'est au bain-marie, bien entendu, que Lecanu sèche le sérum. Puis il le traite successivement à l'eau froide, à l'eau bouillante, à l'alcool bouillant, qui doit dissoudre les matières grasses.

La liqueur aqueuse est évaporée, le résidu traité par l'alcool à 40°. Le produit solide, restant, enfin calciné, pour en détruire la matière organique.

Les alcools distillés sont remplacés, sur l'extrait, par de l'alcool à 33°, qui ne dissout pas à froid la matière cristallisée et sépare les matières grasses.

L'épuisement de la substance sèche ou son traitement à l'état frais a fait récemment l'objet de discussions. On est tombé d'accord pour condamner le premier procédé. Le débat s'est renouvelé récemment à propos de la cholestérine. Une généralisation atteignant toutes les liposes et mieux, tous les composés organisés ou leurs dérivés, écarterait du même coup les incertitudes et les discussions stériles. Pour beaucoup d'entre ces produits, on ignore si, à l'état sec, ils sont identiques à ce qu'ils étaient à l'état frais. L'action des réactifs, dans les deux cas, est loin aussi d'être toujours la même. Enfin, la chaleur même modérée, quand on l'emploie pour volatiliser l'eau, n'est jamais négligeable à d'autres points de vue. Les produits biogéniques ou vitaux sont particulièrement sensibles à ses effets. Sans parler des diastases dont les propriétés sont si profondément modifiées sous l'influence d'une faible élévation de température, on sait quelles difficultés s'élèvent quand il s'agit d'évaluer les extraits secs totaux, au cours des analyses biologiques. Les poids varient avec les conditions de la dessiccation et ces conditions demandent à être fixées, moyennant quoi le mal n'est peut-être pas très grand au titre de comparaisons en série, surtout cliniques. Il le devient, au contraire, soit dans des recherches précises, soit quand il s'agit d'extraire ou de doser certains éléments.

On connaît l'altérabilité de l'urée, la sensibilité de la lécithine et la délicatesse de la plupart des autres complexes, y compris les albuminoïdes qui demandent à être traités avec de sérieux ménagements. Les traitements à froid auront donc toujours nos préférences et la chaleur n'interviendra qu'à bon escient.

Les moyens mécaniques comme la centrifugation, les actions physiques, la dialyse par exemple, sont en même temps recommanda-

bles. Les sels neutres et surtout les solvants neutres, absolument indispensables dans un très grand nombre de cas, seront employés à froid, sauf quand une élévation de température sera jugée utile. Mais ici l'inconvénient disparaît ou est très atténué, suivant les circonstances, en raison de la limite de température imposée par la présence du solvant et de l'action mitigée de la chaleur par cette présence même. C'est ainsi que l'urée résistera à 100° en solution étendue dans l'eau, tandis qu'elle subira une décomposition à sec ou en solution concentrée à cette même température, telle que celle d'un bain-marie bouillant.

Nos anciens semblent avoir méconnu ces faits de primordiale importance. Nous les voyons indifféremment, tel Lecanu, faire usage des solvants avant ou après le séchage et utiliser la dessiccation à chaud, au bain-marie il est vrai, dans le but d'analyser des matières animales ou végétales.

La dessiccation, même à froid, à l'aide du vide ou non, n'est pas sans soulever des objections. Dans ces conditions, les meilleures pourtant, un organe frais, nous l'avons noté souvent, arrive à perdre autre chose que de l'eau. Elles constituent malgré tout, le meilleur système quand il y a lieu de préparer des organes secs en leur conservant leurs principes avec le maximum d'intégrité. Cela est presque vrai au point de vue chimique, c'est tout à fait vrai probablement sous le rapport physiologique, puisque, avec nos procédés d'observation, nous ne saisissons pas de différence entre l'action de l'organe ainsi desséché et l'action de l'organe frais.

L'emploi du bain-marie et des solvants était courant en Chimie biologique bien avant Lecanu. Les chimistes des siècles passés avaient étudié les effets destructeurs du feu sur les substances organiques et ils savaient les incinérer et les distiller à feu nu. Au XVIII[e] siècle l'usage du bain-marie était habituel.

D'autre part, rappelons-le ici, on connaissait l'action précipitante de l'alcool sur le sang et, à la fin de ce siècle, on n'ignorait pas la nature albuminoïde, — analogue au blanc d'œuf, — du précipité formé. Depuis, l'alcool n'a pas cessé d'être destiné à cet usage jusqu'à nos jours et sa double propriété de séparer la presque totalité des protéines en récupérant la plupart des autres composés, y compris les liposes, est constamment utilisée.

Boudet. — En 1833 paraît le mémoire de Boudet : « Nouvelles recherches sur la composition du sérum du sang humain » (39). Il marque une étape importante dans l'histoire des liposes hématiques. Boudet, en effet, explique com-

(39) Boudet. *Annales de chimie*, 1833, t. 52.

ment il a découvert la *cholestérine* du sérum, dont on voit appliquer le nom pour la première fois à une substance entrant dans la composition du sang.

On connaissait cette matière depuis Conradi et Poulletier de la Salle qui l'avaient extraite de certains calculs biliaires.

Chevreul avait mis en lumière quelques-unes des plus essentielles de ses propriétés chimiques et surtout son inaltérabilité en présence des alcalis, Il était donc possible de l'identifier.

Nous relevons l'Historique suivant dans les *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale* (1889), de Chevreul (40) recueil des travaux des trois quarts d'un siècle :

« Poulletier de la Salle a obtenu le premier la cholestérine » en traitant les calculs biliaires humains par l'alcool bouil- » lant. Fourcroy et Bostock l'ont considérée comme saponi- » fiable. Fourcroy l'a rapprochée d'une matière grasse qu'il » obtint en 1785 d'un foie humain qui s'était décomposé » spontanément et en 1786 de cadavres enfouis dans la terre. » Il a considéré ces trois substances comme une même subs- » tance qu'il a appelée *adipocire*. Le 19 septembre 1814, à » l'Institut, je fis voir ces substances différentes et les carac- » térisai par la manière dont elles se comportent avec la » potasse ».

Après avoir desséché et pulvérisé le sérum, Boudet le traite par l'alcool bouillant. Le résidu provenant de l'évaporation de cet alcool est épuisé par l'alcool froid, lequel est abandonné à l'évaporation spontanée : des paillettes se déposent mélangées de cérébrine et d'oléomargarate de soude. Ces paillettes sont très solubles dans l'alcool chaud, mais non dans l'alcool froid, au moins quand celui-ci est exempt d'un corps gras susceptible de les dissoudre.

« Et même les sels gras paraissent être les agents qui tiennent la cholestérine en solution dans le sérum ».

Cette assertion, reprise par des contemporains, contient peut-être une grande part de vérité. Tous ces corps, lipoïdes et lipoïnes, sont miscibles les uns avec les autres.

De l'*huile d'œuf* étant séparée du jaune après épuisement de

(40) *Loc. cit.* p. 34.

celui-ci à l'alcool chaud, cette huile, à son tour, s'isole en grande partie de l'alcool, par refroidissement. Quand, au bout de quelques jours, nécessaires à l'établissement d'un équilibre physique, on filtre l'huile bien privée d'alcool, au besoin par l'adjonction d'un moyen approprié, cette huile, pourtant limpide, contient encore de la cholestérine et de la lécithine.

De même, si l'on dissout de l'*huile d'œuf lécithinée* naturellement ou artificiellement, au moyen de chloroforme, il est impossible d'en précipiter complètement la lécithine, même par un grand excès d'acétone. Un partage s'effectue toujours du moment que le mélange chloroforme + acétone contient forcément de l'huile.

La même huile d'œuf dissoute directement par l'acétone abandonne la majorité de sa lécithine sous l'influence du solvant, mais en retient toujours une certaine quantité, même quand celui-ci est ajouté en excès.

Cette seconde expérience est décisive : le coefficient de solubilité de la lécithine par l'acétone, en effet, s'il n'est pas nul, est au moins très inférieur à ce qu'il devient par l'adjonction d'une très petite quantité d'huile. Au contraire, à la première expérience, on pourrait objecter la présence du chloroforme, facteur de conservation, et il faudrait alors prouver qu'un même excès d'acétone est capable de précipiter un même poids de lécithine, dissoute dans la même quantité de chloroforme. Ainsi serait démontré le pouvoir dissolvant de l'huile malgré les conditions opposantes. Nous reviendrons plus tard sur ces expériences, avec chiffres à l'appui.

Le point capital du travail de Boudet est évidemment la découverte de l'*hémo-cholestérine*. Il l'a identifiée à la cholestérine des calculs biliaires. L'aspect, la cristallisation, la solubilité, le point de fusion sont les mêmes. Inaltérabilité également en présence de la potasse bouillante, action positive de l'acide sulfurique, qui la rougit.

Pour démontrer la présence d'un corps nouveau dans un agrégat organique ou minéral, il y a plusieurs procédés. La voie indirecte utilisée si heureusement, par exemple, dans les analyses minérales qualitatives; l'extraction du corps recherché et son isolement : c'est le cas de la cholestérine de Boudet; enfin la caractérisation *intra substantiae* suivie de l'isolement ou non, telle, par exemple, la découverte du radium.

Boudet n'a pas cherché à évaluer la quantité de cholestérine qu'il avait trouvée. Ses successeurs, d'ailleurs, n'y sont parvenus qu'avec des erreurs considérables et jusqu'à ces derniers temps encore, les procédés de dosage de la cholestérine ont été fort débattus. Nous y reviendrons avec détails.

Dans le même Mémoire que nous analysons, Boudet croit avoir découvert un deuxième principe immédiat.

Comme pour la cholestérine, il agit sur le sérum séché. Il l'épuise par l'eau, le dessèche à nouveau et le traite par l'alcool bouillant qui, refroidi, donne des plaques d'aspect gras et nacré, fondant à 36°, et auxquelles il donne le nom de *séroline*.

Pendant longtemps cette séroline a été considérée comme un véritable principe immédiat. Ce n'était qu'un mélange où il y avait sans doute de la cholestérine.

Les acides gras, l'oléate et le margarate de soude avaient été signalés dans la bile par Chevreul, puis par Braconnot (41). Berzélius et Boudet, presque en même temps, paraissent être les premiers à les avoir étudiés dans le sang.

Après avoir fait un extrait alcoolique de sérum à chaud, Boudet en sépare la séroline, la cérébrine et la cholestérine, évapore à siccité, traite le résidu par l'alcool à 22° pour retirer encore un peu de graisse cérébrale, puis dissout par l'éther qui laisse des traces de sels minéraux.

L'éther évaporé, il reste un produit acide où Boudet crut à la présence des savons sodiques des acides oléique et margarique (*). Il en fait une solution aqueuse chaude : l'acide chlorhydrique y détermine des flocons qui viennent surnager sous forme d'huile. Lavée, cette huile rougit le tournesol, se dissout dans l'alcool et l'éther en les rendant acides, se recombine à la soude en redonnant un savon. Nous verrons plus tard ce qu'il faut penser de la présence des savons sériques.

Denis. — Denis, médecin de Commercy, dans son beau livre de 1838 (42), auquel nous avons déjà fait des emprunts, résumant les travaux de ses prédécesseurs, relatifs aux substances grasses du sang, dit : « Les corps gras qu'on a » reconnus dans le sang sont au nombre de six : cérébrine, » séroline, cholestérine, acides oléique et margarique et un » acide gras volatil. La petite quantité qu'on en obtient ne » m'a pas permis de les étudier à fond. Leur affinité entre

(41) Braconnot. *Journal de Chimie médicale*, 1825.

(*) Par acide margarique, il faut très probablement entendre l'acide palmitique ou un mélange de ce dernier avec un autre acide lipoïque.

(42) *Loc. cit.* p. 2.

» eux et celle, des acides gras pour les subtances colorantes » sont trop intimes pour qu'on puisse déjà en fournir une » analyse exacte; aussi, cette partie de l'examen chimique » du sang réclame-t-elle de nouvelles recherches ».

On ne saurait mieux s'exprimer sur un tel sujet et à telle époque. De nos jours encore, la séparation des principes immédiats constitutifs des graisses, offre de sérieuses difficultés en maintes circonstances. Il en est de même quand il s'agit d'en extraire les substances colorantes, surtout sans dénaturer ces dernières. C'est, au reste, à cette affinité envers les liposes qu'elles doivent leur nom de lipochromes.

En distillant du sang au bain-marie, Denis formule les remarques suivantes : « L'intérieur des récipients et du col des » cornues paraissait comme s'il eût été frotté avec un corps » gras. Un lavage à la potasse, à l'alcool ou à l'éther détrui- » sait promptement cette propriété. Elle provenait donc réel- » lement de la présence d'un corps gras ».

Il note ensuite que l'éther, agité avec le liquide de condensation, prenait, en effet, un peu de corps gras.

Il observe aussi l'odeur particulière du sang ainsi distillé. Il l'attribue à un corps sulfuré : « La graisse sulfo-phos- » phorée de cette humeur (sang), la cérébrine, offre seule » ce corps simple (soufre) parmi ses composants. C'est donc » elle qui, se détruisant alors (par la chaleur), fournit l'odeur » remarquée ».

A propos de la cérébrine, Denis, après avoir mentionné les recherches de Berzélius et de Chevreul sur la fibrine, de Vauquelin, qui signala quelques années ensuite, un corps gras analogue à la cérébrine dans le sérum, reconnut, dit-il, en 1828, que ce corps était le même que celui de la fibrine. Il note encore sa présence dans le caillot. Enfin il confirme l'existence du soufre et du phosphore dans la constitution de la cérébrine. Remarquons qu'un tel corps correspond à ce que Kossel et Freigtag appelèrent protagon dont la cérébrine ne serait qu'un dédoublement.

Pour la préparer à partir du sérum ou du sang, Denis dessèche ces humeurs, réduit l'extrait sec en poudre et l'épuise par l'alcool chaud. Après refroidissement et filtration, puis

évaporation, il lave le résidu avec de l'alcool froid à 35°. La cérébrine reste indissoute.

Autre procédé : le sang est soumis à l'alcool froid (40°) qui précipite les albumines, mais celles-ci entraînent la séroline, une grande partie de la cérébrine et une portion de la cholestérine; l'alcool dissout l'autre portion de cholestérine, un peu de séroline, de la cérébrine, des sels gras (savons) et la substance jaune. On évapore à siccité et on traite le résidu par l'alcool à 35°. Restent la cérébrine et un albuminate de soude qu'on séparera à leur tour par de l'alcool bouillant à 40°.

Le précipité albumineux est soumis à une autre dose de ce même alcool bouillant, qu'on renouvelle tant qu'il fournit un précipité en refroidissant. On filtre après quelques heures et on l'évapore lentement en le réunissant à celui qui a agi sur le mélange de cérébrine et d'albuminate. Quand le produit est sec, on le lave avec de l'alcool froid à 35°. Après dessiccation, on obtient la *cérébrine*.

Le précipité albumineux précédent, épuisé par l'alcool bouillant, l'est encore par l'éther bouillant. On totalise alors toutes les graisses. Denis dit qu'on en obtient ainsi une quantité supérieure à celle fournie par ses premières analyses où il opérait sur du sang desséché et lavé d'abord à l'eau bouillante, d'une manière analogue, du reste, à celle de ses devanciers.

Pareille conclusion ne saurait nous surprendre. Nous l'avons déjà fait remarquer. Les éléments délicats des agrégats organisés ne s'accommodent pas aisément d'une élévation de température, même faible, et surtout due à la chaleur sèche. Eut-elle lieu à froid, la dessiccation peut encore s'accompagner de pertes en principes volatils, particulièrement en acides gras. Et d'ailleurs rien ne dit que de tels principes ne trouvent justement des conditions de formation dans la concentration même de leur liqueur mère. On n'est en droit actuellement d'appliquer de telles méthodes qu'après une expérimentation comparative, conduisant à des résultats très voisins ou capables d'assurer une estimation satisfaisante des erreurs.

Qu'encore il ne soit pas certain qu'une application directe des solvants comme l'alcool et l'éther n'apporte des troubles dans la constitution naturelle des agrégats organisés, il n'en est pas moins sûr qu'ils demeurent les seuls, *a priori*, à notre disposition avec le concours d'agents mécaniques ou physiques (centrifugation, froid, osmose, etc.), pour conduire une analyse immédiate à ses fins les

plus souhaitables. De telles prévisions sont, en effet, confirmées le plus souvent *a posteriori* par comparaison des résultats, tirés de méthodes différentes.

Un lavage préalable à l'eau du sang sec, constituait une autre erreur au point de vue de l'analyse générale. Nous connaissons bien aujourd'hui l'action altérante (hydrolisante ou autre) de l'eau.

La précipitation des albuminoïdes du sang par l'action directe de l'alcool était un progrès considérable dans l'étude chimique de ce milieu, on ne saurait trop y insister.

Denis tient la *séroline*, découverte par Boudet en 1833, comme un *principe immédiat* existant, puisqu'il lui accorde une mention particulière, donne ses propriétés et la manière de la préparer.

C'est, dit-il, une matière blanche, légèrement nacrée. Elle rougit comme la cholestérine par l'acide sulfurique concentré. Inattaquable aux alcalis, elle est soluble dans l'éther, peu dans l'alcool, surtout froid. La chaleur la décompose, mais une partie paraît se volatiliser sans altération.

Comme on voit, ce sont là des propriétés de la cholestérine, qui devait former en majorité le mélange appelé séroline et dont les propriétés prépondérantes masquaient les propriétés particulières aux autres fractions du mélange.

Préparation de Denis : Action de l'alcool puis de l'éther sur le précipité albumineux du sérum placé à l'intérieur d'un entonnoir entouré de charbons embrasés. Après quelques heures, filtrer l'alcool sur un papier taré, sécher à 30° cent. et peser.

C'était se donner bien du mal pour doser une entité chimique inexistante.

Remarque. - Nos entonnoirs, chauffés à l'eau ou à la vapeur, étaient inconnus dans les laboratoires à cette époque, bien que leur vulgarisateur Lebon fût mort depuis 1804. Le gaz d'éclairage d'ailleurs, en France, attendait encore en 1838 ses applications au chauffage et à l'éclairage. Le chauffage, pour aider aux réactions dans les laboratoires, était habituellement obtenu par combustion du charbon de bois.

Cholestérine : Denis donne la préparation de Boudet. Nous n'y revenons donc pas.

Denis croit à l'existence des savons et décrit les expé-

riences de Berzélius et Boudet déjà citées. Il termine son étude sur les corps gras hématiques en exposant une méthode générale d'extraction et une méthode d'analyse.

Extraction. — Traiter le sang ou le sérum par l'alcool froid, distiller aux trois quarts pour ne pas perdre l'acide gras volatil. Abandonner ce concentrat quelques jours à lui-même en vue de laisser cristalliser la cholestérine et la cérébrine, évaporer en entier et traiter par l'eau acidulée chaude. Les graisses surnagent unies à la substance jaune.

Denis veut évidemment parler des acides gras.

Les méthodes modernes d'extraction ne sont pas beaucoup plus perfectionnées dans leurs grandes lignes. Elles appliquent presque toujours les principes énoncés précédemment et tirent surtout leurs avantages et leur précision de l'emploi du vide, de la force centrifuge et de l'application stricte de conditions bien déterminées.

Denis ajoute que si l'on veut l'*acide gras volatil* à part, il faut distiller le sang frais avec l'acide sulfurique étendu et agiter les liquides de condensation avec de l'éther.

Au cours de l'analyse générale indiquée plus haut et des traitements à l'éther qu'elle comporte, ce solvant entraîne les corps gras généralement colorés en jaune. Cette coloration est attribuable aux substances dénommées lipochromes.

Quelle est la nature de ces lipochromes?

Les sérums sont plus ou moins foncés en couleur. Ils le deviennent surtout au cours des ictères par rétention et, de fait, la bilirubine augmente dans les états cholémiques (Gilbert et Herscherr).

On peut décolorer les sérums au cours des traitements éthérés destinés à recueillir les graisses. Celles-ci entraînent la ou les substances colorantes. La bilirubine et les lipochromes du sang ne seraient-ils donc pas liés par des relations de parenté, sinon d'identité?

Cette question a préoccupé Denis. Pour lui, la substance jaune, le principe colorant du sérum, doit être le même que celui de la bile, d'ailleurs très peu connu à son époque, et il donne les preuves de l'existence de la bile dans le sang normal.

Cette opinion était discutée avant lui. Beaucoup, en effet, tenaient pour une origine toujours pathologique.

Analyse. — Denis précipite la masse sanguine par l'alcool froid, lave le précipité à l'alcool froid, puis à l'alcool bouillant sur un entonnoir entouré de charbons embrasés, enfin à l'éther bouillant.

Voici un exemple d'analyse extrait de l'ouvrage de Denis :

Sérum = 1000 parties

Oléate de soude.	3000	Substance jaune biliaire.	3000
Margarate de soude		Substance bleue trace .	
Acides gras volatils unis à la soude.			

Substances grasses neutres. . .	Séroline.	1,167
	Cérébrine . . .	5,833
	Cholestérine . .	

L'analyse élémentaire (*) de ce dernier groupe y démontre l'existence des éléments suivants : hydrogène, carbone, azote, phosphore, soufre, oxygène.

Nous savons la séroline n'être qu'un mélange. La cérébrine de Denis et de ses prédécesseurs, considérée plus tard comme un protagon, a été ensuite dissociée du groupe des protagons et regardée comme un dérivé de dédoublement. Les protagons eux-mêmes, longtemps assimilés à des espèces définies, sont simplement, en réalité, des mélanges de composés qu'on a groupés en deux classes, les phosphatides, où prennent rang les lécithines (corps phosphorés et azotés, du jaune d'œuf et du sang, et les cérébro galactosides pourvus d'azote et non de phosphore, groupe auquel appartient la cérébrine, dont le nom actuel, donné par Thudicum et adopté depuis, est celui de *phrénosine*.

Par conséquent, la cérébrine de Denis, à l'instar de la séroline, n'était qu'un simple mélange où il y avait sans doute en proportions variables, suivant le mode de préparation, ou même simplement suivant les conditions physiques de leur extraction, de la cholestérine, de la lécithine, principes dosés aujourd'hui dans le sang, et sans doute une petite quantité de principes extractifs azotés ou d'albumines donnant lieu à la présence d'azote, sans compter naturellement l'azote de la lécithine actuelle.

Ces substances, on l'a vu, étaient obtenues par le refroidissement ou l'abandon de leur solution alcoolique : on comprend ainsi très bien comment ils ne pouvaient être, en général, des corps chimiquement définis.

Les alcools et les éthers d'épuisement du précipité albuminoïde

(*) Cette analyse élémentaire a été reprise à notre époque par Kumagawa et Suto sur les acides lipoïques.

devaient entraîner complètement, comme on le croit aujourd'hui, — mais moyennant certains artifices, — toutes les liposes. Cet entraînement cependant n'est pas limité là : il comprend en outre un peu de protéiques, les substances extractives azotées, l'urée, la bilirubine, etc.

Denis ne signale pas de matières grasses dans les globules.

L'Héritier. — En 1842, L'Héritier fait paraître son *Traité de chimie pathologique* (43). C'est beaucoup moins un exposé de recherches personnelles qu'un groupement méthodique des travaux des contemporains, conçu dans un esprit de critique et de clarté.

Malgré cela, L'Héritier décrit un procédé d'extraction des corps gras, basé sur l'épuisement du sérum *préalablement séché*. On ne saurait lui en tenir rigueur. Si quelques-uns des chimistes de son époque s'y prenaient différemment, ce n'était pas parce qu'ils pensaient mieux faire, puisqu'ils utilisaient également, en lui accordant la même valeur, le procédé à la dessiccation préalable.

Nous reproduisons donc ici le *modus operandi* relevé dans le Traité de l'Héritier et au surplus emprunté par lui, dit-il, à Lecanu :

Le sérum est séché au bain-marie, pulvérisé, placé dans un digesteur et soumis à l'action de l'éther. Après quoi, les trois quarts de l'éther sont distillés, le quart restant étant éliminé au moyen du bain-marie. On obtient un résidu gras, ayant la consistance du miel, d'odeur désagréable, susceptible d'être dissout en partie par l'alcool.

Cette dissolution est jaunâtre, acide. Elle laisse déposer par évaporation spontanée une certaine quantité de cholestérine. On filtre alors et on évapore : il reste une masse jaunâtre, transparente, mélange d'une matière huileuse et d'un solide.

Soumise à froid à une petite quantité d'alcool, celui-ci dissout la matière huileuse. Cette matière est liquide, jaune, très soluble dans l'alcool à froid qu'elle rend acide, soluble aussi dans les solutions alcalines et ne passant pas à la distillation avec l'eau. C'est de *l'acide oléique*.

Quant au solide isolé de ce dernier, pressé entre des papiers

(43) L'Héritier. *Traité de chimie pathologique*, 1842.

Joseph, il est complètement décoloré. Il est d'aspect nacré, peu soluble dans l'alcool froid ; il l'est, au contraire, dans l'alcool chaud qu'il rend acide ; l'éther aussi le dissout. Il fond entre 35° et 58° et ne laisse pas de résidu alcalin à la distillation : c'est de *l'acide margarique*.

L'Héritier, à l'exemple de tous les hématologues de tous les temps, se préoccupe des variations de la composition du sang avec les maladies.

A propos des liposes, il déclare qu'il ne sait pas si leurs proportions sont en rapport avec telle ou telle maladie. L'apparence laiteuse du sang, dit-il, est en rapport avec l'augmentation des matières grasses, mais il n'en conclut pas que cette apparence est due à la présence des liposes.

Celles-ci seraient augmentées dans le rhumatisme aigu (Christison), le délirium tremens (Traill), l'hépatite (Marcet) le diabète (Staker). Le sang normal, ajoute-t-il encore, en contient 0, 257 p. 100. On l'a vu à 3 p. 100, à 4,50 p. 100. (Traill) à 5 p. 100 (Christison).

Cette précision dans les chiffres, poussée à la 3e décimale, même s'il s'agissait d'une moyenne résultant d'un très grand nombre d'analyses, ne serait pas venue sous la plume d'un expérimentateur avisé. L'Héritier, au reste, ne se targuait pas d'être un homme de laboratoire, Aujourd'hui, même avec les avantages dont nous ont fait bénéficier les progrès accomplis, nous n'oserions faire cas d'une 3e décimale dans la plupart des dosages d'ordre biologique. Au surplus, nous savons combien est plus élevée la moyenne notée précédemment. Le temps est donc loin de l'avoir consacrée. La disproportion existant entre les nombres modernes et ceux du premier tiers du XIXe siècle suffirait à nous montrer la défectuosité de l'application des techniques de cette époque, alors que dans leurs principes, ces techniques seraient susceptibles de nous apparaître satisfaisantes.

En revanche, nous avons relevé la remarque ci-après, très intéressante, de L'Héritier, qu'on pourrait attribuer à un savant contemporain, et de laquelle on peut seulement dire qu'elle gagnerait encore en vérité, si les mots *variation* et *altération* étaient associés au mot *interruption :*

« L'interruption des sécrétions et des excrétions non compensée » par l'accroissement ou la modification d'action de quelque » organe, est une cause puissante des altérations du sang ».

Gobley. — L'année 1845 marque une date mémorable dans l'histoire des graisses phosphorées. Nous avons noté qu'elles

furent signalées déjà à la fin du XVIII[e] siècle par Vauquelin et d'autres chimistes. Mais leur constitution était naturellement méconnue. Logiquement, le mystère de la constitution des lipoïnes devait être pénétré le premier. Il en fut ainsi, au moins pour une part, puisque Chevreul a précédé Gobley.

Depuis longtemps (1779), la *glycérine* était connue. Scheele l'avait extraite des huiles en les soumettant à l'action des bases. Pelouze venait de préparer l'*acide glycérophosphorique* (1845) après l'acide *sulfoglycérique* (1836). Cela suffit à Gobley pour caractériser un composé nouveau, par ses produits de dédoublement, conclure à sa spécificité et dévoiler l'essentiel de sa structure intime.

Après ses deux mémoires de 1845 à l'Académie des Sciences, c'est Gobley qu'il faut considérer comme le père du groupe des lécithines.

Rien n'est plus intéressant et édifiant que l'histoire chimique des lécithines. Ce sont des corps très complexes sur lesquels on discute encore aujourd'hui.

Depuis les travaux de Gobley, d'étape en étape, nous assistons au développement du mécanisme par lequel l'esprit humain se perfectionne dans la connaissance d'une espèce biologique compliquée.

Il n'est pas, pensons-nous, d'exemple plus typique à la fois par sa clarté, le nombre des chercheurs voués à la tâche et la succession de leurs découvertes, découvertes échelonnées et espacées dans le temps, à des intervalles, plus capables d'aider à la simplicité chronologique des faits et à la compréhension de leur enchaînement.

L'édifice s'élève peu à peu. Chacun apporte sa pierre et tandis que les nombreux ouvriers, les Vauquelin, les Couerbe, les Frémy, entassent et assemblent les matériaux de leur mieux, mais sans cohésion, les architectes théoriciens ont déjà dessiné des plans et catégorisé leurs visions dans un style. Celui-ci, tel Diakonow (44), tient pour un *sel*; tel autre, à l'exemple de Strecker (45), conçoit un *éther*. La molécule de la lécithine prend des aspects variables, sans doute, avec ses théoriciens créateurs, mais tout de même aspects précis pour chacun d'entre eux.

A la vérité, ces structures moléculaires dissemblables représentent, probablement, autant de réalités.

Il s'agit, à l'heure présente, de s'entendre sur l'assemblage des

(44) Diakonow. *Uber die phosphorhaltigen Körper der Hühner-und. Störeier. Uber das Lecithin. Medizinisch - chemische Untersuchungen*, 1867, p. 221 et 404. — *Uber die chemische Konstitution des Lecithins. Das Lecithin im Gehirn. Zentralblatt für die medizinischen Wissenschaften*, 1868, p. 197, 434, 794.

(45) Strecker. *Uber das Lecithin. Annalen der Chem. und Pharmazie*, 1862, vol. 123, p. 353; 1868, vol. 148, p. 77.

gros fragments de la molécule. L'acide glycérophosphorique paraît être l'inévitable radical sur lequel viennent se greffer d'une part, sur le côté glycérine, les différents acides gras (stéarique, palmitique, oléique, etc.), d'autre part, sur le côté acide, diverses variétés de bases plus ou moins complexes (névrine, bétaïne, choline, etc.).

C'est sur la manière dont ces bases se trouvent liées au résidu moléculaire que s'agitent principalement les opinions.

La constitution de ces bases elles-mêmes est bien connue. Wurtz notamment, a réalisé la synthèse de la *choline*, rencontrée dans toutes les lécithines de l'organisme. Bornons-nous à rappeler qu'elle jouit d'une fonction alcool primaire et qu'en conséquence elle est apte à fournir aussi bien des *sels* que des *éthers*.

Mais revenons au véritable initiateur des lécithines, Gobley. Les travaux de Gobley sont d'un intérêt trop vif au point de vue spécial de cette étude, pour négliger d'analyser ceux qui n'ont point de rapport immédiat avec le sang. Ce sont d'ailleurs les premiers en date. Ils nous conduiront à l'étude de l'hémo-lécithine.

Gobley fait paraître un *premier mémoire* intitulé « Sur la composition chimique du jaune d'œuf » (46). Il opère de la manière suivante :

L'alcool ou l'éther agissant sur les jaunes d'œuf secs, en extraient une huile (huile d'œuf) et une matière visqueuse. Cette matière visqueuse incinérée donne un charbon imprégné d'acide phosphorique. Soumise à l'action d'une solution aqueuse de potasse, il y a dégagement d'ammoniaque. C'est donc un savon d'ammoniaque.

A l'époque de Gobley, on ne connaissait pas les *ammoniaques composées* étudiées par Wurtz (1849) et Hoffmann (1850).

De l'eau chlorhydrique, agissant sur la matière visqueuse, donne naissance aux acides *oléique*, *margarique*, — avec formation d'une *pellicule grise*, — qui viennent surnager la solution aqueuse inférieure. L'éther dissout ces acides et on les purifie par le procédé de Gusserow.

La *pellicule grise*, retenue par le filtre, contient de l'azote et du soufre. L'acide chlorhydrique la colore en bleu et violet : elle est donc différente de la *vitelline*.

(46) Gobley. Comptes-rendus de l'Acad. des Sciences, 1845, t. 21, p. 766.

L'acétate neutre de plomb, versé dans la liqueur aqueuse, précipite une *substance phosphorée.*

La matière visqueuse est, d'autre part, traitée à chaud par une solution aqueuse de potasse, puis consécutivement par de l'eau acidulée au moyen de l'acide acétique. La filtration sépare des acides gras et une *matière azotée.*

Le filtrat est précipité par l'acétate neutre de plomb et le précipité obtenu, lavé, puis soumis au gaz sulfhydrique et à l'eau de chaux jusqu'à saturation. Nouvelle filtration. Le filtrat est additionné d'acide oxalique afin d'en séparer la chaux et la nouvelle liqueur limpide est placée dans le vide, sur la chaux. On obtient alors un liquide épais, visqueux, soluble dans l'eau et l'alcool.

Quel est la composition de ce liquide?

On en fait le sel de chaux, qui est plus soluble à froid qu'à chaud. On le recueille donc en concentrant à chaud.

On fait agir sur lui le chromate de plomb qui en dégage le carbone et l'hydrogène, après combustion, et qu'on dose sous forme d'acide carbonique et d'eau.

La capacité de saturation du sel de chaux est contrôlée par sa conversion en phosphate de chaux au moyen de la calcination.

En conclusion, le liquide visqueux contient glycérine et acide phosphorique. De plus, son analyse fournit les mêmes nombres que l'analyse du phosphoglycérate de chaux artificiel de Pelouze.

Deuxième mémoire de Gobley (47). — Pour évaluer la quantité d'eau qu'il contient, le jaune d'œuf est roulé sur un linge jusqu'à ce qu'il ne soit plus mouillé. Ensuite il est desséché au bain-marie jusqu'à poids constant.

Il n'est pas possible d'approuver — nous en avons déjà fait valoir les motifs, — sinon comme approximatif, ce procédé d'évaluation de l'eau, pourtant encore tellement employé. Comme pour le sang, comme pour l'urine et bien d'autres, il y a des pertes appréciables en principes volatils ou provenant d'altérations.

Gobley continue son analyse en séchant les jaunes sur des

(47) Gobley. *Recherches chimiques sur le jaune d'œuf.* Comptes rendus Ac. des sciences, t. 21, p. 988.

assiettes, puis il les soumet à l'alcool bouillant, qui abandonne la vitelline dont la quantité est ainsi évaluée à 16 p. 100.

L'huile d'œuf séparée de l'alcool donne avec le temps et le froid un dépôt de margarine, d'oléine, de cholestérine et une matière colorante.

L'alcool bouillant enlève à cette huile par épuisement la cholestérine, la matière colorante (*) et un peu d'oléine. Le reste est composé d'oléine et de margarine, puisque l'action de la potasse a pour effet d'en extraire de la glycérine et les acides oléique et margarique.

La proportion de cholestérine (découverte par Lecanu dans le jaune d'œuf) est de 0,438 p. 100 (**).

Une observation intéressante de Gobley :

S'appuyant sur ce que, d'après Wagner, le savon dissout la cholestérine (4 parties de savon dissolvent 1 partie de cholestérine), la cholestérine se trouve sans doute dissoute dans le jaune d'œuf à la faveur des savons.

Gobley se demande s'il en est de même dans le sang et la bile.

La question est de nos jours encore débattue : les lipoïdes sont-ils en suspension dans le sérum — du moins quand ils s'y trouvent à l'état libre, — sous la forme de particules extrêmement fines ou bien, au contraire, y existent-ils à l'état de combinaison instable soluble, ou enfin leur miscibilité ne s'explique-t-elle qu'en raison de la présence de savons, de lipoïnes ou d'autres lipoïdes, ces composés exerçant vis-à-vis les uns des autres des actions spéciales d'affinité — d'ordre physique, pourrait-on dire — les offrant, tout au moins aux recherches, sous les apparences d'une solution? Nous avons déjà présenté ces hypothèses renouvelées de Gobley, comme on le voit. Quoi qu'il en soit, on sait la facile miscibilité des lipoïdes pour leurs semblables ou pour les lipoïnes,

Nous avons analysé ce deuxième mémoire de Gobley uniquement dans le but de montrer l'ancienneté d'un sujet qui reste toujours en discussion.

Nous compléterons l'examen de ce mémoire par la question des matières colorantes dont il n'est pas toujours facile de débarrasser les liposes animales ou végétales.

(*) L'alcool est insuffisant pour décolorer l'huile d'œuf (note de l'auteur).
(**) A remarquer une fois de plus l'insignifiance de la 3e décimale.

Les tissus, colorés le plus souvent en jaune, doivent fréquemment cette coloration aux lipochromes, composés, comme nous le savons, associés naturellement aux liposes, au sein des tissus où elles siègent, et que l'isolement des liposes, — par exemple au moyen de l'éther, — ne parvient pas à écarter des lipochromes.

Les matières colorantes du jaune d'œuf et du sérum sanguin sont des lipochromes. A ce titre, ils nous intéressent. Quand on fait une extraction éthérée de l'un ou de l'autre et qu'on se débarrasse ensuite de l'éther par évaporation, les liposes extraites sont jaunes, depuis le clair jusqu'à l'orangé. Au contraire, la matière épuisée par l'éther est décolorée le plus souvent, ou presque entièrement décolorée.

Ces lipochromes du jaune d'œuf comme ceux des autres tissus n'ont pas d'autre point de ressemblance avec les liposes. Leur nature chimique est parfois très différente. Telle la bilirubine du sérum, qu'en vertu de la définition précédente, on peut parfaitement considérer comme un lipochrome.

Pour en terminer avec le deuxième mémoire de Gobley, ce savant traite encore le jaune d'œuf à l'eau bouillante, qui donne une liqueur acide, le devenant plus encore avec l'alcool absolu, lequel précipite un *phosphate terreux* et une *matière animale* (extrait de viande de Berzélius). Le liquide filtré et desséché est lavé à l'éther. Celui-ci enlève *l'acide lactique*.

D'autre part, *la vitelline* est épuisée par l'eau bouillante et par l'alcool. Elle renferme du phosphore.

Gobley termine enfin en disant quelques mots des matières colorantes. D'après Chevreul, mentionne-t-il, il y en a deux dans le jaune d'œuf, une jaune et une rouge. Gobley confirme ce résultat et ajoute qu'il a trouvé du fer dans la rouge.

Il s'agit évidemment de l'*hématogène* de Bunge, ainsi nommé parce que les hématies lui emprunteraient leur fer. Chevreul, lui, admettait que la matière rouge était analogue à la matière colorante du sang, que la jaune devait être assimilée à celle de la bile.

Nous venons d'étudier les origines de la *lécithine*, de la considérer à son berceau. Dès lors, elle se trouve identifiée comme principe immédiat nouveau. Il nous est loisible, par conséquent, de revenir au sang, où nous allons la retrouver sans nous arrêter aux travaux intermédiaires de Gobley (18).

(18) Gobley. *Recherches chimiques sur la laitance de carpe.* (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1851, 3e série, t. XIX-XX, p. 406).

En 1852, ce savant fait paraître un nouveau *mémoire* relatif aux liposes du sang (48').

Gobley reçoit le sang de la veine dans un flacon contenant de l'éther. Après agitation et décantation, il remet de l'éther dans le flacon et répète cette opération un grand nombre de fois. Il arrive un moment où il se forme deux couches : une inférieure, aqueuse et rouge, une supérieure où se trouve la fibrine retenant de l'éther dans ses mailles. On filtre le tout. On lave à l'éther le filtrat et la fibrine. On distille les éthers réunis d'où résulte une matière grasse n° 1.

On sèche les deux fibrines. Le sérum est desséché à part.

La fibrine desséchée et pulvérisée est traitée par l'alcool à 85° bouillant. L'alcoolat, réduit aux trois quarts et agité avec de l'éther, laisse une substance molle, visqueuse, qui, traitée par l'éther, donne un produit n° 2 soluble, brun rougeâtre, laissant un charbon acide par incinération. Le produit insoluble, blanchâtre, donnant de l'ammoniaque par incinération, se gonflant en présence de l'eau, est de la *cérébrine*.

Le liquide privé de matières grasses, traité par l'acide acétique, à l'ébullition, demeure incapable de fournir des acides gras.

Sérum desséché : Pulvérisé, il est traité par l'alcool à 85° bouillant. La liqueur, filtrée et évaporée, est additionnée d'eau et chauffée pour chasser l'alcool. Le liquide restant est agité avec l'éther.

Cet éther prend une coloration rouge. Il est décanté et évaporé : il laisse une substance molle et rougeâtre n° 3. Il n'y a pas de graisse dans la liqueur aqueuse.

Le poids total de toutes ces matières grasses est de 4 à 5 p. 1000.

Le n° 1 contient du phosphore : il est formé de cholestérine, lécithine, cérébrine, oléine et margarine. L'alcool bouillant à 85° s'empare des trois premiers. Des lamelles brillantes naissent de son refroidissement. A ces lamelles adhère une substance jaune composée de lécithine et de cérébrine, retenant des traces d'oléine et de margarine. Ainsi lavé par l'alcool, le n° 1 est une graisse exempte de phosphore : c'est un mélange de margarine et d'oléine, car la

(48') Gobley. *Recherches chimiques sur les matières grasses du sang veineux de l'homme.* (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, 3e série, tomes XXI-XXII, p. 241 (1852).

potasse en libère, sous forme de savons, les deux acides correspondants.

A l'inverse de l'alcool agissant sur les matières solides, l'éther ne retire pas du sérum liquide, de la graisse phosphorée.

Cholestérine (Boudet 1833). — Le n° 1 est traité par l'alcool à plusieurs reprises; l'alcool décanté et abandonné à l'évaporation spontanée, pendant 24 heures, sépare des cristaux jaunâtres, lesquels sont soumis à l'alcool chargé de potasse. Celui-ci est filtré bouillant. On lave les cristaux à l'alcool et on les purifie en les dissolvant par l'éther et ensuite en leur faisant éprouver plusieurs cristallisations dans l'alcool.

Acides oléique et margarique. — Il n'y a pas de savons dans le sang, comme le veulent Berzélius et Boudet. Nous l'avons démontré plus haut. Un autre motif de négation des savons est que le protoxyde de plomb donne des savons de plomb avec une solution de savon sans laisser d'acides oléique et margarique dans la liqueur.

Les n^{os} 1, 2 et 3 sont triturés séparément avec de l'oxyde de plomb, de l'eau, de l'acétate basique de plomb et de l'éther, puis agités en présence de ce solvant à plusieurs reprises, après son renouvellement. L'éther enlève la totalité de la matière grasse. Le résidu, repris par l'acide acétique dilué, ne donne aucun résultat.

En second lieu, le sérum étant évaporé à siccité au bain-marie, repris par l'eau, est porté à l'ébullition, à la suite de quoi, la liqueur obtenue est filtrée. Le filtrat donne les sels par évaporation. Digérés par l'alcool, ces sels donnent lieu à une liqueur ne renfermant pas de savons, car l'acide acétique à l'ébullition reste sans effet sur la formation d'acides gras. Conclusion de toutes ces expériences : absence de savons dans le sang.

Le résidu précédent, resté sur le filtre, est séché au bain-marie, pulvérisé et bouilli avec de l'alcool. Le filtrat passant au travers d'un filtre est incolore, sans action sur le tournesol. Evaporé, il possède une odeur et une saveur savonneuses. Incinéré, son charbon est acide. Il se dissout dans l'alcool et l'éther, se divise dans l'eau en la rendant mousseuse, comme le ferait un savon. L'addition d'acide acétique

à cet hydrolat donne naissance à un produit huileux surnageant, mais qui n'est point de l'acide oléique ou margarique. Ce produit conserve une certaine viscosité. Au refroidissement, il ne subit pas de modification et gagne le fond du vase. Ce n'est aucun des acides oléique et margarique.

Lécithine. — La seule matière grasse cristallisable est la cholestérine. Le n° 1, traité par l'alcool bouillant, dissout la graisse phosphorée et la cholestérine tout en respectant l'oléine et la margarine. L'extrait alcoolique, provenant de l'évaporation de l'alcool, mélangé d'huile d'amande douce, celle-ci dissout la *cholestérine*. Après filtration, la matière demeurée sur le filtre ne cristallise pas. L'huile traitée par l'alcool bouillant fournit la *cholestérine*.

La matière phosphorée est mise à macérer pendant 24 heures au contact d'eau acidulée par l'acide chlorhydrique Après ce temps, on porte à l'ébullition, on laisse refroidir et on peut séparer une graisse surnageante, mélange des acides cléique et margarique.

Si maintenant, dans l'opération précédente, on remplace l'eau par l'alcool, on obtient comme résultat final des produits identifiables à ceux du jaune d'œuf. Cette matière phosphorée est donc de la *lécithine* et de la *cérébrine*.

Si à la liqueur acide on ajoute de la chaux, qu'on filtre, qu'on évapore, qu'on reprenne par l'alcool, il reste du phosphoglycérate de chaux.

Cérébrine. — Le n° 2 fournit des produits analogues à ceux du jaune d'œuf, des œufs et de la laitance de carpe. Il s'agit donc de cérébrine.

Séroline. (Boudet). — Est-ce un principe immédiat? Non, répond Gobley, car ses propriétés sont variables avec son mode de préparation. Ce n'est qu'un mélange d'oléine, de margarine, de cholestérine et d'une matière albumineuse entraînée.

Gobley fait donc pour la première fois nettement disparaître la séroline de la liste des principes immédiats du sang. De plus, il nie la présence des savons et des acides gras libres. Pour ces derniers, il explique que ses devanciers aient pu les rencontrer parce qu'ils avaient opéré sur du sang altéré par la putréfaction.

Il serait difficile d'invoquer la putréfaction avec nos méthodes actuelles de conservation aseptique. Un alcoolat d'épuisement hématique, soumis à la distillation, fournit un distillat acide, même quand l'opération a porté sur du sang sortant de la veine. Tout au plus, par conséquent, si l'on hésite à admettre la préexistence des acides libres volatils, peut-on supposer leur formation secondaire sous une influence opératoire. Les acides libres volatils, d'après cela, ne sont pas démontrés, mais leur présence n'est pas niable non plus et trouve tout crédit auprès de beaucoup de chercheurs. Les savons, eux aussi, ont subi de nombreux avatars. Ils ont été très discutés. Iscovesco, et d'autres auteurs contemporains, considèrent leur présence comme certaine.

Lecanu (déjà cité). — Chronologiquement doit s'intercaler ici le mémoire de Lecanu, paru dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie*, tome XXII (1852). De la page 337, nous reproduisons, en les résumant, les passages suivants, où il est question des matières grasses des globules rouges. Lecanu obtient les globules à l'état de pureté en précipitant le sang au moyen du sulfate de soude saturé, indiqué pour la première fois par Berzélius.

Les globules restent sur un filtre où on peut les laver avec la même solution saline.

L'analyse des globules ainsi traités a permis à Lecanu d'en extraire : des matières extractives, des *matières grasses*, des matières salines, de l'albumine, une globuline, une matière fibrineuse particulière, l'hématosine.

Un lavage des globules à l'eau, une filtration consécutive, suivie de la coagulation et d'une nouvelle filtration, donnent un extrait, après évaporation, qui cède à l'éther une matière grasse liquide, soluble dans l'alcool froid à 45° et une autre solide, soluble à chaud dans l'alcool à 45°.

Une des grandes préoccupations des hématologistes du second quart du XIX^e^ siècle fut la détermination du rapport des globules humides au plasma. Prévost et Dumas (49), dont la méthode générale d'analyse conserva la faveur des chimistes pendant vingt-cinq ans, eurent recours à une hypothèse en vertu de laquelle l'humidité des globules était considérée par eux comme empruntée au sérum.

On ne connaissait pas encore un moyen de les isoler ou de les laver sans les détruire. Berzélius croyait que l'eau les dissolvait complètement. Prévost et Dumas ont constaté leur simple décoloration; leur *hématolyse* dirait-on aujourd'hui (Examen du sang 1821).

(49) Prévost et Dumas. *Annales de chimie*, t. XXIII, p. 56-75.

Les sérums isotoniques n'étaient même pas soupçonnés, quand Berzélius montra les propriétés heureuses du sulfate de soude saturé, dont l'emploi fut universellement adopté jusqu'à la découverte de nouveaux sels jugés plus avantageux.

Denis (déjà cité). — A ce point de vue comme en beaucoup d'autres, en fait d'études portant sur le sang, Denis fut un initiateur particulièrement sagace.

Son *Mémoire sur le sang* (50), présenté à l'Académie des sciences le 20 décembre 1858, mais daté de 1859, est une œuvre remarquable témoignant d'un très laborieux effort et de hautes qualités d'invention dans la recherche scientifique.

Il est le premier, semble-t-il, à préconiser le chlorure de sodium dans le lavage des globules et il précise la composition optima de la solution chlorurée (8 p. 1000).

Nous sortirions du cadre de ce travail si nous insistions sur ce point qui touche aux origines de l'*isotonie*, des études sur la *résistance globulaire*, etc., si nous rappelions, sans brièveté, avec quelle justesse Denis a montré la non-préexistence de la fibrine dans le plasma, sa théorie de la coagulation et son classement des albumines végétales et animales en huit variétés (sans compter l'hématocristalline des globules réfractaires à la méthode), d'après l'emploi judicieux des sels neutres, sulfate de soude, de magnésie, chlorure de sodium, etc.

Tout l'intéressait, peut-on dire, quand il s'agissait du sang, tout sauf les matières grasses et les sels dont il a absolument et sciemment méconnu l'importance clinique, sinon chimique, à l'instar d'ailleurs de ses contemporains et de ses successeurs, jusqu'en ces dernières années.

Et pourtant rien n'est à négliger dans une étude scientifique. Les études d'ordre biologique et hématique ne sauraient faire exception. Les jugements prématurés basés plus sur des impressions que sur des faits d'expérience ou d'observation précises, — puisque l'hypothèse d'une limite, aux efforts des savants, serait la négation même de la Science, — sont presque toujours démentis par l'avenir. Au contraire, les déductions tirées de ces faits, fortement établis, reçoivent généralement une consécration postérieure. Denis s'en est tenu aux idées de son temps sur la question des hémoliposes et n'a pas cru devoir leur consacrer une attention dont les résultats lui paraissaient d'avance inutiles.

En dépit de ce pronostic, cependant, on a découvert aujourd'hui quelque intérêt clinique au dosage des lipoïdes et, encore obscur il est vrai, au dosage des graisses neutres, à l'évaluation de leurs principes immédiats constitutifs, auxquels nous avons proposé le

(50) *Loc. cit.* p. 28.

nom générique de *lipoïnes*. Et sans doute n'est-ce pas trop s'avancer que prédire un avenir aussi brillant au groupe des substances non encore à beaucoup près différentiées et connues sous le nom de *matières extractives*.

Il y faudra du temps sans doute. Le sang charrie les éléments de la vie; instable et modifiable comme la vie elle-même, peut-être celle-ci y cache-t-elle son mystère. L'étude du sang est donc très ardue et l'on peut sans contredit se ranger, cette fois, à l'opinion de Denis exprimée page 66 de son Traité déjà nommé :

« Le sang renferme un grand nombre de principes dont la » plupart se décomposent aisément ou se modifient sous la » moindre influence; ils se mélangent enfin ou s'unissent inti- » mement pendant les recherches analytiques, de façon à voiler » souvent la vérité. L'analyse la plus difficile à exécuter est » donc celle du sang; et cependant c'est l'analyse dont la phy- » siologie normale et pathologique a le plus besoin, celle » qu'elle réclame comme essentielle à ses progrès ».

Malgré l'exactitude de ces paroles, et nous avons pu nous en montrer surpris, Denis ne paraît guère croire à de nouveaux progrès dans l'étude des hémoliposes. Nous reproduisons, en effet, de la page 39 : « Eau, sels, corps gras, etc. « Le plasma renferme outre ses substances albuminoïdes, une » certaine quantité d'eau, de sels et de corps gras. Ils sont les » mêmes principes constituants qu'on retrouve dans le sérum. » Leur étude a été exécutée par différents chimistes d'une » manière tellement satisfaisante que je n'ai pas été tenté » d'en faire l'objet de nouvelles recherches ».

Pour Denis, par conséquent, la question paraît résolue et sans appel.

Et plus loin, page 76 : « On n'entreprend qu'un travail pure- » ment chimique à estimer les sels et les corps gras, jusqu'ici » sans utilité physiologique ou médicale, de plus extrême- » ment long et difficile, et qu'il faut rendre la pratique de » l'analyse accessible aux personnes peu exercées aux mani- » pulations délicates. J'exclus de ma méthode l'isolement et » la pesée de chaque espèce de sel et de chaque espèce de » corps gras ».

Nous pouvons le regretter. Un esprit de la pénétration de Denis, en application sur le sujet, n'aurait vraisemblablement pas donné de résultats infertiles.

En conséquence, de ces idées un peu préconçues de Denis envers les liposes, nous n'avons pu glaner que peu de choses les concernant dans son livre.

Au cours de l'exposé de sa méthode d'analyse, nous trouvons page 73 : « J'étends dans de l'alcool absolu une portion » encore du même sang (dont il fait l'analyse), jusqu'à ce qu'il » soit bien coagulé en grumeaux fins et qu'il en résulte un » liquide très trouble plutôt qu'une bouillie, et je tiens le » tout à 90° pendant un quart d'heure. Je sépare l'alcool par » le filtre après refroidissement et je lave le coagulum à » l'eau froide. Les liquides contiennent le groupe salin et » gras avec quelques matières extractives, et j'ai ainsi, après » en avoir déduit environ le huitième qui revient au sérum » que contenait le sang, 16,07 de sels, corps gras et matières » extractives ».

On ne s'expliquerait pas le groupement et l'estimation sous un seul nombre, de produits aussi disparates, si l'on n'était averti, à leur égard, de l'indifférence de Denis.

Page 76 il daigne s'occuper un peu du *sérum*. Les matières grasses et colorantes lui sont enlevées en le traitant, desséché, par l'alcool bouillant après l'avoir lavé à l'eau chaude.

Comme on voit, cette technique est demeurée immuable, sans grandes variantes depuis bien des années.

Denis finit cependant par nous donner un aperçu d'une méthode dont une partie présente une originalité. Toutefois, fidèle à ses idées, il ne l'a fait apparaître qu'en conséquence d'un travail dominant où, d'ailleurs, l'urée, le sucre, etc. pourront s'évaluer par la même occasion :

Saturer le sang défibriné à 40° ou 50°, étendu d'un peu d'eau, par du sulfate de soude en poudre. Toutes les matières abuminoïdes, colorantes et grasses sont précipitées. Elles restent sur un filtre maintenu à la même température. On les redissout dans l'eau car elles ne sont pas coagulées. Après refroidissement du filtrat, le sulfate cristallise. Si toute son eau n'est pas solidifiée on l'évapore ; on pulvérise les cristaux et les traite par l'alcool bouillant.

Dans ses tableaux d'analyse, Denis donne toujours le total *sels + corps gras* affectés d'un nombre égal à 16 pour 1000.

Conclusions concernant les périodes ancienne et moderne.

De tous les travaux précédents concernant l'étude des hémoliposes, il ressort, en résumé, que ces substances ont été mises en évidence, extraites ou dosées au moyen de deux solvants, l'alcool éthylique à des degrés variés de concentration et l'éther. Les divers auteurs ont donc tous employé l'alcool et l'éther, mais ils les ont utilisés suivant des procédés différents, dont certains originaux, au début, furent ultérieurement mis en pratique tels quels ou modifiés simplement en quelques-unes de leurs parties.

Ces procédés semblent devoir se ramener à deux principaux :

1° Assèchement préalable du sang, des globules, ou du sérum. Epuisement consécutif à l'alcool et à l'éther.

2° Précipitation du sang par l'alcool où demeuraient dissoutes une certaine quantité des substances, épuisement consécutif du précipité par l'alcool, suivi ou non d'un traitement à l'éther.

Ainsi mis en action, l'alcool et l'éther, chauds ou froids, étaient capables, dans l'esprit de leurs manipulateurs, d'épuiser complètement le sang ou ses dérivés de toutes ses lipoïnes et lipoïdes.

Les extraits éthéro-alcooliques devaient donc comprendre la totalité de ces substances. Restait alors à les séparer et à les résoudre en leurs principes immédiats.

Cette analyse était basée principalement sur des différences de solubilité.

La cholestérine était préparée de cette manière. Quant aux autres — sauf la séroline et la cérébrine reconnues plus tard comme formées de mélanges, — on se bornait essentiellement à démontrer leur présence, soit en mettant les acides gras en liberté pour les lipoïnes, soit en étudiant leurs produits de dédoublement pour la lécithine.

C'est la période des découvertes des principes immédiats gras du sang et il fallait évidemment songer à les identifier, à les qualifier avant de les quantifier. Quant à la préparation

à l'état de pureté, il n'en faut pas parler, sauf peut-être pour la cholestérine, dont les caractéristiques, entre autres le point de fusion, furent données par Boudet.

Nous savons aujourd'hui que l'extraction de la totalité des matières grasses n'était pas complète et, par conséquent, le dosage des principes sur cet extrait total eût péché par la base.

Cependant, la plupart des chercheurs de cette époque préparatoire citent des nombres. Nous les avons mentionnés à leur place.

Ces nombres sont les témoins de la foi des anciens dans leurs méthodes ou plutôt dans l'exécution de ces méthodes. Ils n'attachaient pourtant qu'une importance secondaire à ces déterminations dont ils n'apercevaient pas encore le côté pratique.

C'est, au surplus, quand les applications apparurent avec un caractère nettement utilitaire que les procédés se firent de plus en plus rigoureux et précis. C'est de l'histoire toute récente. Nous trouvons là une explication de l'insuffisance des nombres fournis par les chercheurs de l'époque intermédiaire à laquelle nous avons donné le nom *d'époque moderne*. Cette époque se signale donc, non pas par la rigueur des résultats chiffrés, mais avant tout par la recherche spéculative, par la recherche de nouveaux faits ou la mise au point des faits antérieurement avancés.

Jusqu'à Denis, nous en sommes donc à la connaissance des lipoïnes ou lipoïdes suivants : *cholestérine*, *séroline*, *cérébrine*, *lécithine*, *margarine*, *oléine*, *stéarine*, *acides libres* et *savons alcalins* correspondants.

On discutait, comme nous l'avons dit, sur ces principes, à partir de la lécithine non comprise. On discute encore d'ailleurs. De plus, l'époque contemporaine a rayé la séroline et la cérébrine de la liste précédente, comme composés non définis.

La cholestérine et la lécithine d'abord considérées comme existantes totalement à l'état libre, sont admises actuellement comme partiellement combinées, au moins en ce qui concerne la cholestérine, dont une partie serait sous forme d'éther, une autre sous forme de protéides, une troisième libre. Rien ne dit qu'il n'en va pas de même pour la lécithine.

Tous ces corps n'étaient donc pas dosés ou ils l'étaient mal.

Il en fut de même les années suivantes, jusqu'à nos jours.

En revanche, au cours de ces mêmes années de transition, on va s'efforcer de caractériser et d'évaluer ces principes au sein des portions constitutives du sang, dont on entreprendra une séparation exacte, non pas comme conséquence d'une étude de partage à faire de ces substances grasses, mais inversement, parce qu'une connaissance plus approfondie du sang, après l'isolement de ses différentes parties, aura permis d'examiner ces parties au point de vue des substances grasses.

Auparavant les globules rouges étaient isolés par le sulfate de soude saturé. Ce sel présentait des inconvénients, en particulier par sa masse. Il fut très avantageusement remplacé par la solution isotonique, dite physiologique, de chlorure de sodium. A leur tour les globules blancs ou *leucocytes* se virent isolés et analysés pour la première fois.

Salet et Daremberg appliquant au sang la force centrifuge offrirent aux savants un moyen essentiellement pratique, capable, par la seule mécanique, d'entraîner l'isolement des éléments figurés.

Les centrifugeuses furent généralisées d'ailleurs à toutes les branches de la Biologie, où elles rendirent de grands services.

CHAPITRE III

PÉRIODE PRÉ-CONTEMPORAINE

On peut dire, qu'après Denis, nous entrons positivement dans la période contemporaine. Les travaux sur le sang vont se multiplier, surtout autour des albumines, en faveur desquelles Denis vient d'exercer si utilement ses efforts.

La synthèse organique entre dans une voie féconde. Berthelot vient de reproduire l'alcool, la glycérine, alcool triatomique (1854). Bientôt les graisses seront définies par lui comme des éthers de ce dernier corps et préparées artificiellement, conformément à cette définition. Sous les coups répétés des synthèses chimiques des principes immédiats, tirés uniquement jusqu'ici des animaux ou des végétaux, la barrière dressée entre les théories de la chimie minérale et de la chimie vitale s'effondre peu à peu.

La chimie biologique s'édifiera d'après cet esprit nouveau au cours de la seconde moitié du XIX^e^ siècle.

Après les travaux de Schutzenberger sur la constitution des albumines, nous verrons même des tentatives de reconstitution de ces complexes considérés comme le substratum chimique essentiel de la vie elle-même. Le sang, fleuve nourricier aux souples méandres, agent essentiel des échanges nutritifs, milieu vital par excellence, reçoit le contrecoup des idées nouvelles et, de toutes parts, se trouve soumis aux investigations les plus impatientes.

La séparation et l'isolement à l'état de pureté des globules rouges, l'hémoglobine et ses dérivés, les leucocytes, la coagulation, le plasma, le sérum, font l'objet de nouvelles et nombreuses descriptions. Les diastases entrent en scène. On

reconnaît leur rôle prépondérant dans tous les phénomènes de la vie, à tel point qu'il n'en est peut-être pas un qu'on ne puisse rapporter à une ou plusieurs actions diastasiques et qu'il devient, en conséquence, évident, de considérer la vie comme un ensemble synergique de fermentations et de condenser toutes ces énergies composantes positives sous une définition résultante unique : *la vie est une fermentation.*

Poser une telle conclusion n'est-ce donc pas rétablir la Biochimie sur ses anciennes assises, considérer la force vitale comme différente des forces agissantes dans le domaine minéral? Evidemment non.

Celles-ci, coordonnées et dirigées, conduisent aux mêmes résultats que la première, donnent naissance aux mêmes corps, aux mêmes principes immédiats. Faudra-t-il donc juger de ces effets identiques à l'identité des forces causales? Tout le monde s'accorde pour l'affirmative. Et d'ailleurs ne trouve-t-on pas des actions analogues en chimie minérale, également mystérieuses dans leur mécanisme intime? La *catalyse*, en un mot, ne peut-elle être rapprochée des phénomènes diastasiques?

Tandis que s'acharnaient les savants à découvrir des faits nouveaux dans le domaine de l'hématologie, à démêler et à interpréter les phénomènes, tandis que successivement s'échafaudaient les théories, à mesure que les procédés d'observation et d'examen se perfectionnaient, les lipoïnes et les lipoïdes furent tenus pour notoirement d'importance toute secondaire jusqu'en ces toutes dernières années où fut placé, en complète lumière, le rôle incontestable de quelques-uns d'entre eux, dans un certain nombre de processus normaux ou pathologiques.

Stimulés par l'utilité d'un nouvel objet, les chimistes reprennent alors l'étude de la lipo-hématologie qui paraissait leur avoir révélé jusqu'à son dernier secret.

Une ère nouvelle commence. Elle est tout à fait actuelle. On cherche des procédés de dosage rigoureux. Aucun des procédés ne l'était. On cherche aussi des procédés rapides capables de fournir des résultats peut-être approximatifs, mais comparables et offrant néanmoins une utilité en clinique, analogue à celle du dosage clinique de l'urée. Il faut aussi opérer sur une quantité de sang aussi faible que possible.

Les anciens avaient à leur disposition le sang de toute une saignée, soit environ 500 grammes et plus. Ce volume a graduellement diminué jusqu'à 50 et 90 grammes. Aujourd'hui, on arrive à se contenter de quelques centimètres cubes, parfois 2 ou 3 suffisent (colorimétrie de Grigaut, par exemple). Il faut savoir tirer parti d'aussi faibles volumes. Les analyses de sang se multipliant, les indications des saignées, par contre, se sont faites singulièrement plus restreintes. Pour les recherches scientifiques, on dispose, il est vrai, du sang des animaux.

Quand il s'agit des applications à la physiologie ou à la pathologie humaine, il convient d'adapter les dosages aux quantités de sang réduites qui, par leur soustraction, sont incapables d'entraîner des troubles appréciables chez les patients, si bien qu'actuellement 10 à 30 centimètres cubes suffisent généralement pour doser l'urée, le sucre, les lipoïdes.

Hermann. — En 1865, Hermann donne une méthode qui paraît bien inférieure, à première vue, à celle de Denis, consistant à traiter le magma de globules et de sulfate de soude par l'alcool et l'éther. Hermann traite la liqueur exprimée du caillot à travers un linge, par une quantité d'éther capable de la sursaturer, agite vivement à 30° ou 35° et décante de nouvelles quantités d'éther à plusieurs reprises. Il filtre, évapore et obtient un résidu presque entièrement cristallin, formé de graisses, de cholestérine en aiguilles et de lécithine en petites houppes. Ajoutant de l'eau, le protagon se gonfle et devient peu soluble dans l'éther. Celui-ci entraîne alors les graisses et la cholestérine. Le résidu dissout dans l'alcool à 50° donne par refroidissement des cristaux de lécithine (ou de protagon).

L'éther agissant directement sur le sérum étendu d'eau ou non, est absolument impuissant à en retirer toutes les liposes, comme il l'est aussi quand on le fait agir sur le sérum desséché, comme il l'est également dans le cas du lait et autres produits biogéniques (engendrés par la vie).

Hoppe Seyler. — Un grand nom dans l'histoire de la Chimie biologique est celui d'Hoppe Seyler. Peu de questions

touchant ce domaine l'ont laissé indifférent. On peut dire que ce ne fut presque jamais en vain. La Science lui doit des travaux très remarquables. Toutefois, en lipohématologie il ne sut pas s'affranchir des errements de ses aînés. Comme eux, il fait intervernir l'éther sur le sérum sec, qu'il acidifie, il est vrai, dans le but d'en extraire la cholestérine (51) dont il trouve ainsi dans 100 centimètres cubes de sérum du sang d'oies grasses de 0 gr. 019 à 0 gr. 314.

Pour doser les lipoïnes, la cholestérine, la lécithine du caillot, Hoppe Seyler le traite desséché, successivement, par l'alcool froid, puis bouillant et l'éther. En acidulant la portion extraite par l'alcool et l'évaporant en présence d'une petite quantité de chlorure de sodium ou de chlorure de calcium en solution alcoolique, puis en traitant par l'éther, on a la cholestérine. En reprenant par l'alcool absolu, on aura les corps gras. La lécithine reste comme résidu et est appréciée par un dosage de phosphore.

La plus grande erreur, erreur double, d'un tel système est de s'attaquer au sang desséché. On se trompe donc deux fois, puisqu'on n'est sûr ni de la quantité, ni de la qualité des corps extraits.

Hoppe semble signaler pour la première fois la lécithine (52) dans le sérum « découverte par Gobley dix ans auparavant », remarque avec justice Armand Gautier dans sa *Chimie appliquée à la Physiologie* (1874).

Dans cet ouvrage, ce savant décrit, à son tour, un dosage simultané de l'hémoglobine, des graisses, de la lécithine et de la cholestérine : Traiter le sang défibriné par son volume d'une solution au 1/10^{e} de chlorure de sodium, chauffer 2 heures à 40°, agiter le magma formé, après 24 heures, avec un mélange d'eau et d'éther.

La globuline reste insoluble, la majeure partie des graisses, la cholestérine, la lécithine, sont dissous par l'éther, l'hémoglobine reste en solution dans l'eau.

Cette solution aqueuse est évaporée dans le vide froid et sec, puis séchée à 100°, d'où résulte l'hémoglobine plus des sels alcalins. On calcine après un lavage à l'alcool à 80° qui

(51) Hoppe Seyler. *Medizinisch. Chemisch. Untersuchungen*, t. I p. 140, 1866.
(52) Hoppe Seyler. *Jahresb.* p. 745, 1866 ou *Handbuch. der Chemischen Analyse.*

enlève des traces de matières extractives azotées. On dose les corps gras dans l'éther.

Handbuch der Physiol. und Pathol. Chemischen Analyse (53) nous explique un procédé d'analyse du sang dont l'auteur est encore Hoppe Seyler et dont nous donnons un résumé complet en raison de son importance :

Hoppe divise le sang en quatre portions :

20 à 50 centimètres cubes sont reçus dans un vase à précipiter avec trois ou quatre fois ce volume d'alcool froid. Après un repos de plusieurs heures on filtre sur filtre taré exempt de cendres. Le précipité est lavé sur le filtre avec de l'alcool absolu chaud (*a*) puis avec un mélange d'alcool et d'éther (*b*), enfin avec de l'eau chaude (*c*). Hoppe signale qu'une petite quantité de matière albuminoïde se trouve entraînée par l'alcool, ce qui est absolument exact.

Après le passage de l'eau chaude, le filtre taré, lavé à l'alcool, est porté à l'étuve à 120° pour en effectuer la pesée. Ensuite incinéré en creuset de porcelaine, on en déduit les cendres qui, soustraites du précipité total, donnent la somme fibrine, hémoglobine et matières albuminoïdes du sérum.

Evaporé au bain-marie (*a*) fournit un résidu auquel on ajoute (*b*) qui ne le dissout pas entièrement. On filtre donc. Le dépôt est lavé avec un peu d'alcool absolu puis avec (*c*), puis à l'eau. On se trouve alors en présence d'une liqueur alcoolique et éthérée (*b'*) et d'une liqueur aqueuse (*c'*). Le résidu lavé est une matière albuminoïde qu'on ajoute à (*b*).

L'extrait aqueux (*c'*) séché à 110° et incinéré donne les sels.

L'extractif alcoolique éthéré (*b'*) contient : cholestérine, lécithine, matières grasses, urée, glucose, sels à acides organiques et une trace NaCl. On évapore à 70° puis dans le vide. Le résidu épuisé par l'éther en laisse un second insoluble (*e*).

La solution éthérée (*d*) évaporée, séchée et pesée, fournit la quantité totale de matières grasses, lécithine et cholestérine. (*e*) est détaché du filtre par un filet d'eau sur une capsule de porcelaine tarée, évaporé, séché à 100° puis à 110°. Son incinération donne les cendres.

(53) P. 39, Berlin 1872.

Traitement de (*d*). — On chasse la plus grande partie de l'éther, on introduit le reste dans un vase à précipiter, évapore au bain-marie, dessèche dans le vide sulfurique et pèse rapidement.

On reprend par l'alcool bouillant et ajoute une solution alcoolique de potasse. Après une ébullition de plusieurs heures, l'évaporation consécutive laisse cholestérine, névrine, phosphoglycérate de potasse et des savons. La dissolution dans l'eau est agitée ensuite plusieurs fois avec de l'éther qui dissout la cholestérine.

L'évaporation de cet éther donne donc cette substance souillée d'un peu de savons, dont on la prive par l'éther absolu.

La solution aqueuse additionnée d'un excès de salpêtre, évaporée, est finalement calcinée au creuset d'argent. On dissout la masse restante au moyen de l'eau nitrique, on chauffe afin de chasser les gaz oxyazotés et soumet la liqueur à un repos de onze heures après l'avoir additionnée d'un excès de molybdate d'ammoniaque.

Du poids de phosphore on déduit celui de la lécithine, lequel est ajouté à celui de la cholestérine. L'ensemble de ces deux poids retranché de l'extrait éthéré donne la quantité pondérale des graisses neutres.

Tous ceux qui ont répété ces expériences pourront s'étonner de cette conclusion pour le moins un peu téméraire. En ce qui concerne la cholestérine notamment, il est bien difficile de l'avoir pure et surtout en totalité en respectant ces conditions. De plus, l'extrait éthéré étant largement pourvu d'impuretés, la détermination par différence des graisses neutres, comme il vient d'être indiqué, est entachée d'erreurs considérables.

Ces réserves faites, on doit reconnaître à cette méthode une grande supériorité sur toutes les autres exposées précédemment. Cette supériorité provient, en premier lieu, de la saponification préalable, laquelle arrête toutes les graisses quand elle est bien conduite. De plus, le lavage à l'eau de l'éther est incontestablement à recommander : il élimine la plus grande partie des savons et des matières extractives, sans compter une notable proportion de pigments. Cette méthode, dans son principe, est encore suivie aujourd'hui. Des perfectionnements de détails, principalement réalisés par Kumagawa et Suto, l'ont rendue exacte. La lécithine est également dosée à la manière de Hoppe Seyler qui suppose que tout le phos-

phore de l'extrait éthéré provient de ce lipoïde qu'il réduit à l'aide de calculs basés, en somme, sur une hypothèse.

C'est ainsi, en effet que continuant son analyse, Hoppe Seyler évapore à sec la solution aqueuse soutirée. Le précipité est redissout dans l'ammoniaque étendue. Ajoutée à cette liqueur, la mixture magnésienne fournit un précipité de phosphate ammoniacomagnésien qu'il est facile de transformer en pyrophosphate de magnésie, dont le poids multiplié par 7,2748 donne en définitive celui de la lécithine correspondante.

Nous reproduisons, à titre d'exemple, parmi les analyses de Hoppe Seyler, les nombres suivants résultant de deux analyses des globules d'un sang humain (homme) :

Hémoglobine.	867.9	943.0
Matières albuminoïdes et nucléines. .	122.4	51.0
Lécithine.	7.2	3.5
Cholestérine.	2.5	2.5

En possession d'une méthode, sinon parfaite, du moins bonne quant à son principe si ce n'est quant à ses détails d'exécution, les chercheurs pouvaient entreprendre sur des bases assez sûres la résolution de certains problèmes concernant la nature des combinaisons sous lesquelles les liposes se trouvaient engagées au sein du milieu sanguin.

Groupe des *lipoïnes* : principes gras neutres, acides libres, savons, autres combinaisons, glycérine.

Groupe des *lipoïdes* : Cholestérine libre ou combinée, éther de la cholestérine, autres combinaisons, lécithine libre et combinée, nature de ses combinaisons, éléments de sa décomposition : glycérophosphates, choline. Autres lécithines. Phosphatides.

Enfin il y avait aussi à étudier tous ces principes avec leurs proportions relatives, leur génèse, leurs transformations, leurs destinées, dans le plasma et dans les cellules, les hématies, les leucocytes, le sang au niveau des différents territoires, l'influence du jeûne, de l'alimentation, etc.

Nous avons voulu assigner à ce travail un cadre trop réduit pour nous permettre de discuter tous les travaux parus sur ces objets, dont beaucoup d'ailleurs sont encore en cours d'études et le seront longtemps sans doute, malgré le perfectionnement actuel des méthodes de recherches et de dosages.

Hoppe Seyler a voulu montrer l'existence certaine des savons, qui avait été contestée par Denis, par Lebedeff (54) par

(54) Lebedeff. *Maly's Jahresbt.*, XIII p. 34.

par Röhrig (55) en 1874, et par d'autres. Hoppe Seyler donne des chiffres. Il y aurait, d'après lui, 0,05 à 0,12 p. 100 de savons exprimés en acides gras. Dans un cas de pneumonie chez l'homme, il a trouvé 0,062 de savons à côté de 0,1318 p. 100 de graisses neutres (56), de 0,216 de cholestérine et de 0,3506 de lécithine.

Remarquons en passant qu'à cette date, Hoppe Seyler trouvait des teneurs, en ces deux derniers lipoïdes, analogues à celles qui sont données par les plus récentes publications.

A ce point de vue là encore, signalons les chiffres de Manasse (57) et d'Abderhalden, qui, pour les globules rouges, trouvent, le premier, 1,867 p. 100 de lécithine sur le résidu fixe, le second 2,5 à 5 p. 1000 de lécithine sur les globules humides; d'Hepner (58) et d'Abderhalden, qui évaluent, le premier, à 0,275 p. 100 la cholestérine libre sur le résidu fixe chez le cheval, à 0,552 p. 100 chez le chien; le second, de 0,0388 à 0,0661 p. 1000 sur les globules humides chez le cheval, de 0,2115 à 0,1255 p. 1000 chez le chien.

Lilienfeld (59) a donné une analyse des leucocytes. Voici ses nombres sur la substance sèche : lécithine 4,51, cholestérine 4,80, graisses 4,02 p. 100. A ce propos, n'oublions pas qu'on a dit que la lécithine et la cholestérine provenaient de la destruction des globules blancs après la sortie du sang hors des vaisseaux.

Voici maintenant les résultats de Weigert (60) fournis par un sang (de chien) rendu incoagulable par une injection de peptone :

Extrait éthéré °/₀	Alcalinité de l'extrait alcoolique en $SO^4 H^2$ N/10	Acide gras combinés à l'état d'éther °/₀
5 gr. 752	2 cc. 3	4 gr. 234
Acides gras combinés à l'état de savons °/₀	**Acides gras libres °/₀**	**Glycérine libre °/₀**
0,531	0, gr. 320	0

(55) Röhrig. *Ibid.* t. IV, p. 113 et t. VII, p. 50.
(56) *Zeitsch. für Physiol. Chem.* t. VIII, p. 503, 1884.
(57) Manasse. *Zeitsch. für Physiol. Chem.* p. 437, 1890.
(58) Hepner. *Archiv. flüg.* t. LXXIII, p. 595, 1899.
(59) Lilienfeld. *Zeitsch. für Physiol. Chem.* t. XVI, 1892.
(60) Weigert. *Arch. für die ges. Phys.*, p. 86, 1900.

Drosdoff (61) cite les chiffres suivants :

	VEINE PORTE	VEINES SUSHÉPATIQUES
Cholestérine.	2,59	2,73
Lécithine.	2,45	2,90
Graisses	5,75	0,97
Hémoglobine, albumines et sels insolubles.. . . .	251,75	237,88

Ces nombres montrent que si l'on peut discuter les moyens qui ont servi à les obtenir, on ne peut nier qu'ils ne soient comparables aux plus récents, comme on le verra par la suite.

Les auteurs, des travaux analysés jusqu'ici, semblent bien admettre dans le sang, comme on le voit, l'existence simultanée des *lipoïnes neutres*, et des *lipoïdates alcalins*, c'est-à-dire des savons proprement dits, si souvent, et tour à tour admis et contestés auparavant.

(61) Drosdoff. *Zeitsch. für Phys. Chem.* t. I. p. 233, 1877.

CHAPITRE IV

PÉRIODE CONTEMPORAINE OU ACTUELLE

Nous arrivons maintenant à une période plus immédiatement contemporaine.

Hepner. — Envisageons la cholestérine avec la méthode d'examen de Hepner (62).

Le plasma est traité par 4 volumes d'alcool, agité et placé 48 heures à l'étuve où il continue à être agité souvent. Après décantation, le résidu est pressé, puis repris par les 2/3 du volume d'alcool primitif, lequel est porté à l'ébullition au bain-marie. Ensuite, l'alcool est décanté. On reprend encore une fois à l'alcool, qui est décanté, et le précipité est enfin repris plusieurs fois par de l'alcool chaud.

Les solutions sont réduites partiellement au bain-marie et chauffées avec de l'eau pour éliminer l'alcool. La liqueur aqueuse est épuisée à l'éther.

L'extrait éthéré est chauffé à l'ébullition avec de l'éther acétique et ensuite refroidi. La cholestérine et ses éthers sont, en effet, facilement solubles dans l'éther acétique à chaud et à la température ambiante. La première cristallise en belles aiguilles au cours d'une évaporation lente. Les autres substances se séparent à froid.

La solution d'éther acétique est donc filtrée. Les portions solides qui se séparent sont reprises deux fois de la même manière à l'éther acétique. Ensuite, on les lave à l'éther acétique

(62) Hepner. *Archiv. für d. ges. Physiol*, Bd. 73, S. 602, 1898.

froid jusqu'à ce qu'une goutte de l'éther acétique évaporé sur un verre de montre ne laisse aucun résidu.

La solution d'éther acétique étant colorée est bouillie avec un peu de charbon animal, puis filtrée. Le charbon est lavé tant qu'une goutte de lavage laisse un résidu. Le soluté incolore est distillé et le résidu pesé.

Pour le sérum, l'extrait éthéré est chauffé avec de l'éther acétique. Par refroidissement, un précipité se sépare; puis l'éther acétique est évaporé, le résidu redissous dans l'éther. De la solution éthérée, *l'éther oléique* cristallise après addition d'un peu d'alcool, grâce à une évaporation prolongée. La solution mère contient la cholestérine libre (?)

Hürthle. — Hürthle (63) s'est également occupé de la question des éthers de la cholestérine.

Voici comment il convient d'opérer d'après lui.

Bien que *l'oléate de cholestérine* ne se dissolve que peu dans l'alcool, il est cependant au mieux, extrait du sérum à l'aide de l'alcool.

Le sérum est inondé de trois volumes d'alcool à 96 p. 100. On filtre. Le résidu est soumis à nouveau au même volume d'alcool. Cette opération est répétée jusqu'à six fois à une température de 30 à 40° C., en agitant fréquemment. L'alcoolat contient presque toute la quantité d'oléate de cholestérine existant dans le sérum.

Par refroidissement, le liquide se trouble et est rempli le lendemain d'aiguilles d'oléate de cholestérine. Si le sérum en est pourvu notablement, il se dépose déjà à la température ambiante. Pour l'obtenir complètement, il est nécessaire de diluer l'alcool avec de l'eau et d'abandonner au froid. Les derniers restes ne se laissent seulement obtenir qu'en évaporant l'alcool.

Dans beaucoup de cas, avant les longues aiguilles de l'oléate, il se forme de petites aiguilles ou de petites lamelles s'étalant à la surface du liquide. C'est *l'éther palmitique* qu'on peut rassembler sur un filtre.

Purification de ces éthers. On les dissout dans l'alcool à l'étuve à 40° en agitant souvent. Pour les séparer grossière-

(63) Hürthle. *Zeitsch. für Physiol. Chem.* Bd. 21, S. 331.

ment on fractionne la dissolution : les éthers à point de fusion élevé se dissolvent les premiers.

On peut aussi ajouter à l'alcool chaud les éthers dissous par un peu d'éther éthylique en agitant sans cesse. Dans ce cas, les éthers de la cholestérine ne cristallisent pas; ils restent huileux. La formation des cristaux exige toujours beaucoup de temps. Ici l'alcool se refroidit trop vite et l'éther s'évapore de même.

On ne peut évidemment considérer ces descriptions de Hepner et Hürthle comme des méthodes de dosage des éthers cholestériques. Ce sont des modes de préparation ou de démonstration d'existence de ces composés.

Ce ne seraient point les seules combinaisons de la cholestérine.

Grigaut (64) pense même que la majeure partie de la cholestérine du sérum serait à l'état de combinaison protéique. Il se fonde sur les considérations suivantes :

« 1° Le sérum sanguin *agité directement avec l'éther* ne lui » cède que de faibles quantités de cholestérine, même lorsque » l'agitation a été prolongée et l'extraction répétée à plusieurs » reprises.

» 2° Le sérum sanguin *desséché et épuisé à l'éther* dans un » appareil Soxhlet ne cède jamais qu'une partie de sa cho- » lestérine, même lorsque l'épuisement a été poursuivi pen- » dant plusieurs jours ou plusieurs semaines.

» Mais cet état de choses se trouve modifié dès que l'on » fait agir sur le sérum une cause capable de détruire l'inté- » grité des substances albuminoïdes et dans ces conditions » l'épuisement complet peut-être obtenu. C'est ainsi qu'agis- » sent la digestion pepsique, l'extraction alcoolique, l'hydro- » lyse par les alcalis ou les acides. Ce sont ces considéra- » tions qui nous ont conduit à penser que la cholestérine » existait en majeure partie dans le sérum sanguin sous forme » de combinaisons complexes avec les albumines pour les- » quelles nous avons proposé le terme de *protéo-cholesté-* » *rides* ».

64 Grigaut. *Les protéocholestérides du sérum et leur dédoublement en vue de l'extraction totale de la cholestérine.* Soc. de Biol., 8 juin 1912.

Hepner et Hürthle croyaient la totalité de la cholestérine à l'état d'éthers oléique et palmitique avec prédominance du premier. Comme on le voit, Grigaut fait une place importante aux *protéo-cholestérides*, et quant à la cholestérine libre, qui semblait devoir disparaitre de la nomenclature, elle y reprend son rang, au moins au point de vue pathologique, avec Widal, Weill et Laudat, qui ont isolé du sérum de deux malades atteints d'ictère par rétention, une proportion importante de cholestérine libre en plus de ses éthers. Il n'est pas dit que ce soit en plus des protéocholestérides. Ceci, par conséquent, n'apporte pas une précision très nette quant à l'état premier de la dite cholestérine.

Enfin, nous avons l'impression de n'être point fixé absolument non plus, d'après cela, sur le degré de liberté chimique plus ou moins grande de la cholestérine circulante du sang. Un dosage direct de la cholestérine libre (procédé Windaus) dissipera ultérieurement nos incertitudes à cet égard.

Les formes combinées de la cholestérine, dont nous venons de parler, sont relatives au sérum. Pour être complet, ajoutons qu'on ne sait exactement sous quel état elle figure dans la constitution des hématies et des leucocytes. Au même titre que les autres lipoïdes, elle jouerait, d'après un certain nombre d'auteurs, le rôle de protecteur de la cellule vis-à-vis des agents cytolitiques. Grigaut admet qu'elle imprègne les hématies en restant à l'état de liberté.

Si quelques doutes subsistent encore au sujet des combinaisons diverses de la cholestérine circulante, on peut dire qu'en ce qui concerne la lécithine, le sujet n'a même pas été jusqu'à présent sérieusement envisagé. On a pourtant des précisions sur la nature des composés de la lécithine au sein des autres tissus : sous le nom de vitelline, jécorine, nous connaissons, par exemple, des complexes de lécithine qu'on a pu mettre en évidence dans le tissu nerveux, le jaune d'œuf, des végétaux, etc. Rien de semblable n'a été encore caractérisé dans le sang. Tous les auteurs, jusqu'ici, ont parlé de l'hémolécithine comme si elle y existait à l'état libre et tous admettent à la suite de Gobley, Hermann, Hoppe-Seyler, Manasse, Abderhalden, Peritz, que cette lécithine est une

monoaminomonophosphatide stéarique puisqu'ils la dosent en établissant leurs calculs sur cette supposition.

A la suite des travaux des physiologistes et des cliniciens sur le rôle de protection des lipoïdes à l'égard des éléments cellulaires contre certains agents, sur leurs variations symptômatiques ou leur action pathogénique au cours de certains processus morbides dont le nombre ne paraît pas à ce jour limité, de nouveaux travaux chimiques ont été suscités tout récemment, comme on sait, surtout au point de vue du dosage de ces corps.

Nous avons désigné cette période de recherches sous le nom de période contemporaine. Les précédentes étaient remplies plutôt par des travaux de chimie pure : les liposes n'apparaissaient point comme pouvant présenter un intérêt médical. Toute l'attention du médecin était concentrée sur le métabolisme azoté, par exemple sur les dosages de l'urée dans l'urine et le sang, ou bien encore sur la qualification ou la quantification de certains corps, dont la présence ou simplement les excès extraphysiologiques sont révélateurs de processus morbides. Parmi ces corps il y a lieu de citer l'albumine urinaire, le sucre, l'acétone, etc.

Avec la période contemporaine nous pourrons constater une orientation nouvelle de l'hémato-chimie. C'est la cholestérine qui en a fourni le prétexte, nous savons à la suite de quelle influence.

Les chimistes commencent à s'astreindre à vérifier si leurs méthodes sont capables d'extraire des tissus et du sang la totalité des liposes. Cette question avait été jusqu'ici fort négligée, bien que de primordiale importance.

Pfluger. — Pflüger (65) agissant pendant un mois, au moyen d'un appareil Soxhlet, sur de la poudre de tissu desséchée, montre qu'une extraction ultérieure donne encore un résidu de matières grasses.

Dormeyer. — Considérant que celles-ci peuvent se trouver à l'abri des atteintes de l'éther par suite de la présence des protéiques, Dormeyer (66) après un épuisement aussi complet que possible de la poudre desséchée, en fait une digestion pepsique et procède derechef à un second épuisement.

(65) Pflüger. *Uber die Entstchung von Fett aus Eiwei im Körper der Tiere. Arch. f. d. ges. Physiol* 51, p. 277.

(66) Dormeyer. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 61, p. 341 et 65 p. 90.

Rosenfeld. — Rosenfeld (67) fait intervenir l'alcool sur la poudre sèche, puis le chloroforme.

Liebermann et Székely. — Tous ces procédés concernent l'extraction en bloc de la totalité des matières grasses, respectant le plus possible leur état primitif. En voici un dont le but est l'extraction des acides gras saponifiés et de la cholestérine. Les auteurs, Liebermann et Székely (68) emploient pour la première fois la *saponification directe* des tissus qu'ils soumettent à l'ébullition en présence d'un alcali.

Cette saponification immédiate ne rend pas impossible, en effet, tout dosage autre que celui de la cholestérine. Elle rassemble, au contraire, les acides lipoïdes sous forme de savons. Ces acides deviennent alors dosables comme la cholestérine.

Kumagawa — Suto — Shimidzu. — Kumagawa et Suto s'inspirent de ces considérations et en tirent le plus heureux parti. Nous allons résumer ici leur mémoire (69) où l'on retrouve des qualités de haute précision et de patiente ingéniosité toute scientifique.

D'après Shimidzu, leur technique de saponification directe n'est pas appliquable au sang. Elle fournit des chiffres trop bas. Elle a été établie, du reste, sur des tissus musculaires réduits en poudre sèche, mais en raison de son importance de méthode de dosage biochimique, nous nous devons de la décrire ici. Elle a, de plus, servi de terme de comparaison à une méthode d'extraction à l'alcool, perfectionnée par les auteurs de la première méthode, et la seconde méthode (à l'alcool) a été reconnue bonne par Shimidzu dans ses applications hématologiques.

Méthode de saponification directe de Kumagawa et Suto. — 2 à 5 grammes de poudre sèche sont bouillis 2 heures au bain-marie en vase couvert avec 25 cent. cubes d'une solution sodique à 20 p. 100. Agitation fréquente au cours de la réaction. Celle-ci terminée, le tout est versé dans une ampoule à décantation de 250 cent. cubes. On y ajoute 30 cent. cubes H Cl à 20 p. 100. La liqueur étant encore chaude, on lui

(67) Rosenfeld. *Centratbl. f. inn. Med*, 1900, *21*, n° 33, p. 833.

(68) Liebermann et Székely. *Arch. f. d. ges. Physiol. 72* p. 360 (*Eine neue Méthode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch. Kot usw.*).

(69) Kumagawa et Suto. *Ein neues Berfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischen Material nebst der Kritik einiger gebraüchlichen Méthoden.* (*Biochemische Zeitschrift*, 1908, VIII, p. 211-347) (Aus dem Medizinisch-chemischen. Institut der Universitat Tokyo).

adjoint les 20 premiers cent. cubes d'acide, puis après agitation et refroidissement, les 10 derniers. Cette acidification a pour résultat un abondant précipité.

On laisse refroidir davantage et on arrose le tout de 70 à 100 cent. cubes d'éther suivi d'une forte agitation.

Ce qui reste du précipité se sépare en une couche mince au niveau de séparation des liqueurs aqueuse et éthérée. Après quelques minutes de repos, la couche aqueuse claire est décantée et l'éther coloré en brun, de son côté, reçu dans un verre.

Le précipité resté dans l'ampoule est lavé deux fois avec 5 à 10 cent. cubes d'éther. Ce dernier est ensuite soumis plusieurs fois à l'action de soude normale, environ 5 cent. cubes chaque fois, et 30 à 50 cent. cubes d'éther sont à nouveau consacrés au lavage de cette solution alcaline. Ce mélange est additionné de la solution aqueuse fortement acide précédemment séparée. On agite le tout. La réaction acide persiste, en sorte que les acides gras passent tous dans l'éther.

La totalité de l'éther est évaporé. Le résidu est repris avec de l'éther absolu, lequel est filtré sur amiante et évaporé à son tour. L'extrait éthéré obtenu est séché quelques heures à l'étuve à 50°, puis repris par l'éther de pétrole dont on ajoute environ 20 ou 30 cent. cubes sur la matière encore chaude, en agitant doucement le vase. Un léger trouble apparaît. Le vase, couvert d'un verre de montre, est laissé au repos une demi-heure ou une heure. Au bout de ce temps, l'émulsion se résout en une résine qui gagne le fond et une portion claire.

L'éther de pétrole, filtré sur amiante, donne un filtrat incolore qui, évaporé, est desséché à 50° jusqu'à poids constant. A noter qu'une dessiccation insuffisante de l'extrait éthéré avant l'entrée en jeu de l'éther de pétrole ne conduit pas à l'obtention des acides lipoïques purs, incolores.

Ces acides ainsi obtenus sont dissous au moyen de 50 à 70 cent. cubes d'éther de pétrole et versés dans une ampoule à décantation. On y fait intervenir une quantité telle de solution N/5 de potasse dans l'alcool absolu que celle-ci s'élève à 30 ou 40 fois le volume de l'extrait éthéré obtenu. Le mélange est fortement agité un certain nombre de fois, laissé au repos, ce qui donne lieu à une solution absolument claire,

puis additionné exactement d'un volume d'eau égal à celui de la liqueur éthylo-alcaline à N/5 employée. La conséquence d'un pareil traitement est d'abord un abaissement approximatif de la concentration de l'alcool à 50°, d'où il résulte une séparation de l'éther qui monte à la surface d'une couche alcoolique inférieure.

Celle-ci retient les savons; séparée, elle est encore une fois agitée avec 30 à 40 centimètres cubes de nouvel éther de pétrole.

Réunies, les solutions de pétrole sont évaporées. Le résidu retient de petites quantités d'acides lipoïques dont il est privé de la manière suivante :

L'extrait de pétrole est encore une fois dissous dans un peu d'alcool additionné de 0,5 à 1 centimètre cube de solution alcoolique de soude N/10, évaporé au bain-marie, séché de 15 à 30 minutes à 100°. La matière sèche encore chaude est épuisée à l'éther de pétrole, filtrée sur amiante, évaporée et séchée à 100°, jusqu'à poids constant. Ce poids est celui des insaponifiables : cholestérine et autres substances insaponifiables inconnues.

Méthode d'extraction par l'alcool. — Le travail de Kumagawa et Suto, basé sur la saponification préalable, est précédé d'une étude concernant l'énergie d'extraction des divers solvants vis-à-vis des graisses tissulaires. La conclusion est que l'alcool fort, employé à chaud, est seul capable d'épuiser complètement les tissus. Le tableau ci-après nous fournit les pouvoirs comparatifs suivants. Chaque liquide est employé à une température voisine de son point d'ébullition.

Alcool absolu	100 %
Alcool méthylique	99
Éther acétique	77
Chloroforme	72
Acétone	62
Benzine	53
Éther absolu	46
Éther de pétrole	45

Nous verrons que l'extraction à l'alcool peut être précédée utilement, dans le cas des tissus frais (sang, lait, œufs, etc.), d'une désalbumination à l'acétone.

Après avoir fait l'extrait alcoolique au moyen d'un appareil Soxhlet modifié, sur lequel nous reviendrons, Kumagawa et Suto en font dériver un extrait éthérique qu'ils saponifient par un alcali en solution dans l'alcool. Ils évaporent l'alcool, reprennent par l'eau acidulée et cette eau elle-même à l'éther pour en retirer les acides gras et l'insaponifiable.

La portion éthérique est évaporée et l'éther absolu en donne un extrait nouveau.

Les lecteurs qui auront suivi notre Historique reconnaissent là toutes les opérations déjà utilisées depuis longtemps dans les méthodes de nombreux savants. Cette méthode à l'alcool de Kumagawa et Suto est même, en quelque sorte, la reproduction de celle de Hoppe-Seyler exposée avec détails page 69, et les suivantes. On ne saurait dire, par conséquent, que Kumagawa et Suto l'ont inventée [*] et quand ils continuent en reprenant leur dernier extrait d'éther absolu, auquel nous nous sommes arrêtés (voir plus haut) par l'éther de pétrole, on ne peut dire davantage qu'il s'agit là d'une originalité, puisque, soit dans un but d'extraction, soit notamment dans un but de purification, il était courant avant eux d'utiliser ce produit dans les analyses des matières grasses. Tous les ouvrages spéciaux en témoignent [70], et Kumagawa et Suto eux-mêmes le reconnaissent expressément [70'].

La *saponification directe*, elle-même, n'est pas de leur invention et pas plus que la méthode précédente à l'alcool, ils n'en réclament d'ailleurs la paternité, puisqu'ils en font remonter l'origine à Lieberman et Székely.

Mais s'ils n'ont imaginé ni les principes, ni même l'ordre des moyens d'exécution, ils ont perfectionné ces moyens de manière à tirer d'eux le maximum de rendement possible. C'est là leur seul mérite, mais tous ceux qui ont l'habitude du laboratoire et qui ont examiné de près les modifications de détail introduites par Kumagawa et Suto reconnaissent, il faut le dire, que ce mérite est grand, car chez ces travailleurs on admire non seulement une part d'ingéniosité d'ordre pratique, mais un labeur patient considérable.

Si la méthode de saponification directe a été reconnue inapte au dosage des hémoliposes par Shimidzu, en revanche, toutes les faveurs de celui-ci sont réservées à la méthode à l'alcool qu'il donne pour excellente dans ce cas.

Nous n'insisterons pas ici davantage sur cette méthode. Elle calque ses opérations finales sur celles de la saponification directe.

[*] Kumagawa et Suto ne revendiquent pas, d'ailleurs, l'invention de leur méthode. Il ne faut pas confondre, en effet, *invention* avec *perfectionnement* d'une méthode dans ses détails d'exécution. C'est ce qu'on a fait parfois et c'est pourquoi nous y insistons tellement.

[70] Voir notamment Lewkowitsch : « huiles, graisses et cires ».

[70'] *Biochemische Zeitschrift*, 1908, VIII, p. 260.

Au surplus, nous y reviendrons avec détails, à propos de notre propre méthode, avec laquelle nous la discutons.

Enfin, si l'on désire en avoir auparavant une idée très nette, il suffit de se reporter à la note à l'Académie des Sciences de MM. Grimbert et Laudat que nous reproduisons *in extenso* p. 96.

Windaus. — Avec Windaus, nous entrons dans cette phase des travaux concernant la cholestérine, où l'on cherche à isoler cette dernière en l'engageant dans une combinaison insoluble facilement purifiable.

Windaus (71) montre que la cholestérine forme avec la *digitonine*, glucoside extrait de la digitale, une combinaison insoluble, à la température ordinaire, dans l'alcool à 95° et l'éther. Réuni sur un filtre, ce composé est lavé à l'alcool, à l'éther, pesé. Ce poids multiplié par 0.2431, donne la cholestérine libre seule, précipitée même en présence de ses éthers et d'acides gras. On peut facilement, de cette manière, doser la cholestérine libre et la cholestérine restée combinée qu'il suffira, par exemple, de soumettre à la saponification, de libérer et de précipiter à son tour par la digitonine.

La digitonine précipitant toute la cholestérine et rien qu'elle, comme l'on montré Windaus, Fraser et Gardner (72) elle doit fournir des chiffres précis, d'autant que le composé pesé a un poids quatre fois supérieur à la cholestérine qu'il contient, mais à la condition que ladite cholestérine soit supposée d'abord toute contenue dans la solution où elle vient d'être précipitée. La méthode exige donc l'emploi, en premier lieu, d'un procédé d'extraction rigoureux. Dans ce but, on peut combiner, comme l'on fait Mayer et Schaeffer (73) auxquels nous laissons la parole, la méthode de Kumagawa-Suto, d'une part, et celle de Windaus d'autre part.

« Jusqu'ici, ces deux méthodes, celle de Kumagawa-Suto

(71) Windaus. *Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft.* B. t. XLII, 1909, p. 238. — *Uber die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der cholesterinesters in einigen normalen und pathalogischen Nieren.* (*Zeitsch. f. physiol. Chem*, t. LXV, 1910, p. 110-117).

(72) Fraser et Gardner. *The origin and Destiny of Cholesterol in the animal-Organism Proceed.* (*of the Royal Society*, Série B. vol. LXXXII, 1910, p. 559-568).

(73) Mayer et Schaeffer. Soc Biol. t. LXXII, 1912, p. 362. *Dosage de la cholestérine par les méthodes de Kumagawa-Suto et Windaus combinées.*

» d'une part et celle de Windaus d'autre part, n'ont été » combinées par aucun expérimentateur. Or, il est très facile » de le faire. Il suffit de reprendre, après la pesée, l'extrait » obtenu par la méthode de Kumagawa, extrait qui contient » tout l'insaponifiable, de le redissoudre dans l'alcool à » 95 degrés et d'opérer suivant Windaus. Les dosages de » contrôle montrent que les résultats obtenus sont très satis- » faisants. Pour le sérum par exemple, l'erreur est inférieure » à 2 p. 100 ».

Grigaut. — Dans le but d'obtenir la cholestérine totale, A. Grigaut a également recours à la *saponification directe* des tissus et du sang, mais il provoque cette réaction non pas à la température d'ébullition à la pression ordinaire, comme Kumagawa et Suto, mais à 110° en autoclave pendant une heure. Voici cette technique telle qu'elle est décrite par Grigaut (74).

« 20 à 40 centimètres cubes de sérum sanguin ou 2 à » 10 grammes de tissu frais haché sont placés dans un ballon » de grande contenance avec 60 à 80 centimètres cubes de » soude aqueuse à 20 p. 100. On bouche le ballon avec un » tampon de coton et on porte à l'autoclave vers 110° pen- » dant une heure. Au bout de ce temps, le liquide obtenu » est introduit après refroidissement dans une ampoule à » décantation et agité fortement avec une à deux fois son » volume d'éther ordinaire. On laisse reposer, on sépare » la solution éthérée et on agite le liquide aqueux résiduel » avec du nouvel éther. Les liqueurs éthérées réunies dans » une capsule en porcelaine laissent, par évaporation, un » résidu fortement coloré qui est redissous dans un peu » d'alcool additionné de 1 centimètre cube de soude alcoo- » lique à 1 p. 100. On évapore de nouveau au bain-marie et » on dessèche à l'étuve à 100 degrés une demi-heure. Le » résidu est alors épuisé par l'éther de pétrole que l'on verse » dans la capsule chaude, en remuant à l'aide d'un agitateur » de manière à détacher les particules de substances adhé- » rentes aux parois. Par le repos, la masse des impuretés se » dépose lentement, laissant une liqueur éthérée limpide et

(74) Grigaut. *Soc. de Biol.* 18 nov. 1911, t. LXXI, p. 441.

» incolore, que l'on sépare en jetant le tout sur un entonnoir » dont la douille est garnie d'un tampon d'amiante à peine » tassé. On lave naturellement la capsule, l'entonnoir et » l'amiante avec un peu d'éther de pétrole. Les solutions » éthérées, évaporées dans un vase taré, laissent un résidu » formé de longues aiguilles blanches, soyeuses, présentant » le point de fusion et les constantes physiques de la choles- » térine. Il reste à dessécher le produit à 100° jusqu'à poids » constant avant de procéder à la pesée. »

A. Grigaut a également introduit une innovation ingénieuse dans le dosage de la cholestérine. Il utilise une des réactions colorées de cette substance, la réaction de Liebermann.

Depuis longtemps on connaissait des réactions de ce genre capables de caractériser la cholestérine. Elles acquièrent toute leur intensité et sont d'autant plus nettes qu'elles interviennent sur un produit plus pur. Les colorations sont, en effet, quelquefois modifiées d'une manière fâcheuse par suite des actions auxiliaires de certaines impuretés.

Réaction de Salkowski (75). La cholestérine en solution chloroformique est agitée dans un tube à essai avec un égal volume d'acide sulfurique concentré. La solution de chloroforme se colore du jaune ou rouge sang, suivant la richesse en cholestérine. La couleur persiste longtemps. L'acide sulfurique surnageant offre une fluorescence verte. Étalée sur une capsule plate, la solution chloroformique prend des teintes successives bleue, verte, jaune.

O. Hesse (76) donne la préférence à un acide sulfurique formé de 10 volumes d'acide concentré pour 1 d'eau.

Au chloroforme, Burchard substitue aussi bien les chlorures de méthylène ou d'éthylène, le chlorobenzol, le chlorotoluol.

Terminons en signalant les propriétés spectroscopiques parallèles aux diverses colorations observées : Au rouge correspond une large bande d'absorption entre C et D. Quand la couleur se dégrade et qu'elle devient améthyste, elle corres-

(75) Salkowski. *Pflüger's Archiv.* VI, p. 207.
(76) O. Hesse. *Ann. Chem.* 1882, CCXI, p. 284.

pond à une forte raie en D, une autre forte entre B et F, une plus faible entre D et E. Ce sont là des observations de Krükenberg. (77)

Réaction de Liebermann. — L'anhydride acétique fut d'abord le dissolvant. La solution est alors mélangée avec de l'acide sulfurique concentré, mais celui-ci ajouté goutte à goutte et en refroidissant. D'une coloration rose rouge on passe à une bleue assez stable.

H. Burchard (78) dissout préalablement la cholestérine indifféremment dans l'un des liquides anhydres suivants : chloroforme, chlorure de méthylène, d'acétyle, chlorobenzol, benzol, toluol, xylol, alcool amylique, éther, éther de pétrole, etc.., puis il fait agir la solution sur le mélange sulfurique anhydre acétique.

A ce dernier, d'ailleurs, on peut substituer les anhydrides isobutyrique, benzoïque et phtalique.

Les proportions suivantes sont généralement conseillées :

Solution chloroformique de cholestérine.	2 c.c.
Anhydride acétique	X gouttes
Acide sulfurique concentré.	1 goutte

Une teinte bleue est obtenue en quelques instants.
0 mmgr. 1 de cholestérine peut être ainsi identifiée.

En combinant les deux réactions précédentes, Denigès (79) arrive à déceler 0 milligr. 02 de cholestérine en dissolution dans 1 centimètre cube de chloroforme et à caractériser cette substance au moyen de deux de ses propriétés spécifiques « en agitant d'abord quelques centimètres cubes (2 par exem- » ple), de solution de cholestérine dans le chloroforme avec la » moitié de son volume d'acide sulfurique (de D = 1,76). » L'agitation s'effectue en secouant vivement le tube pendant » au moins une demi-minute : si la cholestérine est à dose

(77) Krükenberg. *Chem. Untersuchungen*, p. 108, 1886.
(78) H. Burchard. *Beiträge zur keuntniss der Cholesterin.* Dissert. Rostock 1889 ; *Jahrb. f. Thierch*, p. 85, 1889.
(79) Denigès. *Bulletin des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, février 1903.

» supérieure à 0 gr. 30 par litre, on observe en premier lieu, » la réaction de Salkowski.

» Quoi qu'il en soit, on fait tomber dans la couche chloro- » formique surnageante de I à V gouttes d'anhydride acétique, » la quantité à ajouter étant proportionnelle à la dose de » cholestérine, c'est-à-dire à l'intensité de teinte prise par le » chloroforme. On secoue légèrement le tube et il se déve- » loppe une magnifique teinte carmin, tirant aisément sur le » violet lorsqu'on augmente la proportion d'anhydride acéti- » que. Quant à l'acide sulfurique sous-jacent, il prend une » teinte rouge sang qui tranche manifestement sur celle de la » couche chloroformique.

» Lorsque la coloration de cette dernière est un peu intense, » elle absorbe, même sous une faible épaisseur, toute la région » verte du spectre; si l'on dilue suffisamment avec du chlo- » forme et si l'on examine au spectroscope, après avoir de » nouveau agité, on aperçoit une large et forte bande d'ab- » sorption couvrant une partie du jaune et du vert, une autre » bande au commencement du bleu et, entre les deux, une » raie fine moins apparente que les précédentes.

» La nature de ce spectre démontre que la matière colorante » qui a pris naissance dans les conditions indiquées n'est » nullement celle qui se forme dans la réaction de Lieber- » mann.

» Ajoutons qu'il n'en est pas ici comme dans la réaction » d'Adamkiewicz, dans laquelle l'agent actif du phénomène » coloré est non l'anhydride acétique, comme on l'a cru long- » temps, mais l'acide glyoxylique, impureté très fréquente de » cet anhydride. Avec la cholestérine c'est l'oxyde d'acétyle » lui-même qui joue le role essentiel dans la coloration ob- » tenue; les composés aldéhydiques, sauf peut-être le formol » et le furfurol, ne modifiant pas sensiblement les résultats » donnés par la seule agitation avec l'acide sulfurique.

» La réaction qui vient d'être développée l'emporte nette- » ment en sensibilité sur celle de Liebermann et de Sal- » kowski : elle permet de caractériser sûrement deux centièmes » de milligramme de cholestérine en dissolution dans 1 cen- » mètre cube de chloroforme, et, en outre, de mettre en évi- » dence, avec la même prise d'essai, deux propriétés caracté- » ristiques de ce produit biologique ».

C'est la réaction de Liebermann perfectionnée par Burchard que Grigaut a ingénieusement utilisée non plus seulement pour déceler la présence de la cholestérine, mais encore pour en déterminer la quantité.

Voici son procédé extrait des comptes rendus des séances de la Société de Biologie (80).

« Dans un flacon de 90 centimètres cubes à large ouverture » et bouchant à l'émeri, placer 2 centimètres cubes de sérum » ou 0 gr. 10 à 1 gramme de tissu frais haché et 20 centimètres » cubes d'une solution de soude à 1 p. 100 dans l'alcool à » 50 degrés. Le tout est plongé au sein d'un bain-marie bouil- » lant pendant 15 à 20 minutes, au bout desquelles se produit » généralement une mousse abondante. On retire alors du » bain-marie, on laisse refroidir et on verse dans le flacon » 50 centimètres cubes environ d'éther. Après quelques secon- » des d'agitation vigoureuse, l'éther rapidement rassemblé » est transvasé dans une ampoule à décantation. Cette opéra- » tion est renouvelée une seconde fois en reprenant le liquide » aqueux résiduel par 30 centimètres cubes de nouvel éther » et les solutions éthérées réunies dans l'ampoule et bien » débarrassées du liquide aqueux, entraîné mécaniquement, » sont agitées avec environ leur volume d'eau distillée, de » manière à éliminer les impuretés qui accompagnent la cho- » lestérine. On laisse déposer et après séparation complète » des eaux de lavage, l'éther évaporé au bain-marie dans une » petite capsule, abandonne sous forme de gouttelettes hui- » leuses la cholestérine encore éthérifiée.

» Afin de procéder à l'épreuve colorimétrique, on ajoute » dans la capsule encore chaude, retirée du bain-marie, » 2 centimètres cubes environ de chloroforme que l'on pro- » mène soigneusement le long des parois. On verse le liquide » dans une petite éprouvette graduée, bien calibrée, et on » réitère cette opération jusqu'à concurrence de 5 centimètres » cubes de chloroforme, auxquels on mélange 2 centimètres » cubes d'anhydride acétique pur et II gouttes d'acide sul- » furique concentré. La réaction de Liebermann se développe » progressivement, et, au bout d'une demi-heure, elle a » atteint son intensité maxima, qu'elle gardera environ le

(80) Séance du 25 novembre 1911, t. LXXI, p. 513.

» même temps. C'est le moment de la comparer à une teinte » étalon facilement fournie par 5 centimètres cubes d'une » solution contenant 0 gr. 06 de cholestérine pour 100 centimètres cubes de chloroforme, qui, placés dans une petite » éprouvette et traités en même temps et dans les mêmes » conditions que la solution de cholestérine à doser, fourniront au bout d'une demi-heure une coloration correspondant » à 1 gr. 50 de cholestérine par litre pour une prise initiale » de 2 centimètres cubes de sérum sanguin. La comparaison » des teintes se fera au colorimètre, en diluant selon le cas » l'une ou l'autre des deux solutions colorées, avec un mélange » en proportions convenables de chloroforme, anhydride acétique et acide sulfurique.

» Si l'on ne craint pas d'être influencé par les graisses et » les lipoïdes autres que la cholestérine, on peut plus simplement et de la façon suivante faire l'épreuve colorimétrique sur l'extrait éthéré obtenu, en appliquant le procédé » d'Adam au sérum sanguin :

» Dans une ampoule galactotimétrique d'Adam, on mélange » 2 centimètres cubes de sérum et 18 centimètres cubes de » la solution de soude à 1 p. 100 dans l'alcool à 50 degrés, » puis on ajoute de l'éther jusqu'au trait 32 centimètres cubes; » on bouche et on retourne plusieurs fois doucement l'appareil comme s'il s'agissait d'un dosage du beurre dans le » lait. Le mélange abandonne par le repos une couche » aqueuse inférieure qui, soutirée, est remplacée à une ou » deux reprises par quelques centimètres cubes d'eau distillée que l'on verse lentement dans l'appareil et en les » faisant couler le long des parois, de façon à éviter les » émulsions. Après séparation complète des eaux de lavage, » on recueille l'éther dans une petite capsule, on rince l'appareil avec un peu d'éther que l'on joint au premier, on » évapore et on achève le dosage comme ci-dessus. Malgré » la présence des différentes matières grasses mêlées à la » cholestérine lors de la réaction colorante, cette technique » donne sensiblement les mêmes résultats que la précédente. »

» Le procédé par pesée et le procédé colorimétrique donnent pour le sérum sanguin des chiffres très comparables. » La divergence entre les deux est au maximum de 1/15 du » chiffre trouvé et toujours à l'avantage du procédé pondéral. »

Nous avons utilisé fréquemment cette méthode. Elle est extrêmement rapide et pratique, surtout quand on se borne à l'exécuter conformément à sa seconde manière, sur laquelle les travailleurs s'accordent généralement pour lui attribuer une exactitude suffisante aux besoins de la clinique.

Il existe des faits, exceptionnels d'ailleurs, où les comparaisons colorimétriques entre la liqueur d'essai et la liqueur étalon sont difficiles, en raison d'une différence notable de nuance. Parfois même l'incertitude est telle qu'il faut renoncer à tirer une conclusion nette. L'étalon présente une nuance verte bien franche ; la solution d'essai s'en éloigne alors trop en tirant vers le jaune. Cette imperfection de nuance est due à la nature et à la quantité des impuretés accompagnant la cholestérine quand on la reprend par le chloroforme. A technique d'extraction égale, ces impuretés sont variables.

Une autre cause d'erreur du procédé colorimétrique réside dans un asynchronisme du maximum de l'intensité des nuances qu'on doit comparer entre elles : il y a un retard entre l'établissement des deux intensités maxima. Par exemple, l'étalon atteint cette intensité au bout d'une demi-heure et la conserve autant. Il arrive que la liqueur d'essai n'atteint à son tour son intensité maxima qu'à partir du moment où la première commence à décliner. Toute comparaison photométrique utile est alors devenue impossible.

Ce retard provient peut-être d'une trop faible teneur de la solution d'essai en cholestérine. On pourrait y remédier en exécutant l'extraction sur une quantité de sang suffisante pour appareiller sa richesse en cholestérine à celle de l'étalon. On peut encore faire l'inverse et diluer cet étalon dans des proportions convenables La photométrie, en effet, n'est applicable qu'à des solutions voisines comme richesse en cholestérine. Ceci oblige parfois, quand on n'a pas de données préliminaires, sur la teneur probable du sang, à faire deux essais, dont le premier n'est qu'approximatif et dirige le second.

Er. Gérard. — Er. Gérard (80′) utilise la propriété que possède la cholestérine de se combiner avec certains anhydrides d'acides (anhydrides acétique, benzoïque, etc.) en formant des éthers insolubles dans l'alcool, pour doser la cholestérine sous cette forme.

« 100 centimètres cubes de sérum provenant du sang d'in-
» dividus normaux, additionnés de sable sec, sont desséchés
» à 100 degrés. Le mélange absolument sec est épuisé pen-

(80′) Er. Gérard. *Sur le dosage précis de la cholestérine dans le sérum du sang normal. Soc. de Biologie*, nº 5, 9 février 1912, p. 168.

» dant 12 heures au Soxhlet par de l'éther anhydre. L'extrait » éthéré provenant de la distillation est saponifié par de la » potasse alcoolique. On fait ensuite passer un courant d'acide » carbonique dans le liquide alcoolique. Celui-ci est évaporé » à siccité en présence du sable lavé et le tout est épuisé » par de l'éther anhydre. Par évaporation des solutions éthé- » rées, on obtient *l'insaponifiable* (cholestérine et impuretés). » Cet insaponifiable est visqueux à 80 degrés, demi-solide à » la température ordinaire. Il est alors indispensable, comme » je l'ai démontré en 1895,de purifier la cholestérine en fon- » dant le mélange impur avec de l'anhydride benzoïque à la » température de 150-160 degrés. La masse éthérifiée est » reprise par de l'alcool à 96 degrés bouillant, lequel aban- « donne, par refroidissement, le benzoate de cholestéryle à » peu près insoluble dans l'alcool froid. Ce benzoate est des- » séché à 100 degrés et pesé.

» Je dois ajouter que pour répondre à l'objection faite qu'on » ne peut extraire du sang la totalité de la cholestérine par » simple épuisement à l'éther (bien que j'aie démontré le » contraire lorsqu'on emploie des produits secs, bien divisés » et de l'éther anhydre), j'ai repris mon mélange de sable et » de sérum épuisé à l'éther, par de la soude à 20 p. 100 à l'au- » toclave à 120 degrés. Or, le produit ainsi traité cède à » l'éther une petite quantité de substances provenant surtout » de l'altération du sérum par ce traitement; on n'obtient que » des traces de cholestérine décelables par la réaction de » Salkowski.

» En opérant comme nous venons de le dire, nous avons » trouvé dans deux expériences différentes 0 gr. 46 et 0 gr. 53 » de cholestérine anhydre pour 1 litre de sérum de sang » normal ».

Si 100 centimètres cubes de sérum étaient nécessaires pour y doser la cholestérine, ce volume, dans la plupart des cas, deviendrait un obstacle sérieux à la détermination pondérale de ce corps au cours de la pratique médicale. Mais les expériences de Gérard paraissent avoir pour but le dosage précis de la cholestérine et cependant ses nombres sont environ la moitié de ceux de Grigaut. Ceux-ci, d'après Gérard, seraient majorés par la présence d'impuretés. Nous avons répété souvent les opérations pondérales de Grigaut et sans rechercher ici si elles fournissent une extraction com-

plète, comme le conteste Iscovesco, elles donnent un produit pur dans la grande majorité des cas. Pour le plus petit nombre, où il faut voir, pensons-nous, le résultat d'une technique défectueuse, attribuable à l'opérateur, la cholestérine est souillée de matières qu'une température de 100 à 110 degrés viscosifie. Par refroidissement, le tout se prend en une masse cireuse englobant les cristaux de cholestérine. Avec le temps cette masse arrive parfois à se fluidifier et coule comme de l'huile.

Nous ne voulons faire aucune hypothèse sur la nature de ces impuretés exceptionnelles et qu'on doit du reste pouvoir éviter. Peu importe si Grigaut n'a établi ses moyennes qu'en les faisant porter sur les pesées de produits vérifiés purs comme il le dit.

Ajoutons que notre propre méthode est en accord avec la sienne que nous avons souvent prise comme terme de comparaison, pour contrôler nos dosages de cholestérine.

Au contraire, si rigoureuse serait la suite des expériences de Gérard, qu'elles pèchent par la base. Avant lui, il avait été prouvé qu'on perdait son temps à s'obstiner à vouloir épuiser complètement par l'éther un tissu préalablement desséché.

On ne peut négliger l'important reliquat lipoïnique retenu par la poudre tissulaire en dépit des retours incessants de l'éther pendant des jours dans un Soxhlet. Pourquoi ce reliquat? Nous ne savons avec certitude s'il faut parler de combinaisons inattaquables, albuminoïdes ou autres (éthers, savons, etc.), ou si, plus simplement, une partie des lipoïnes demeure inaccessible en raison de sa situation au milieu d'une particule protéique périphériquement mais non intérieurement épuisée.

Cette dernière explication est plausible, même avec des poudres aussi fines qu'il est mécaniquement possible de les préparer. Il n'est pas difficile de la conserver nonobstant l'épreuve positive fournie par l'alcool entre les mains de Kumagawa et Suto. Ce fluide est particulièrement avide d'eau, à l'opposé de l'éther, qui en est vite saturé. Il agit sur une poudre anhydre, c'est entendu, état prouvé par la constance du poids à 110°. Rien ne dit que l'alcool ne va pas plus loin que la chaleur, qu'il n'enlève pas une certaine eau plus intimement liée à la molécule protéique, une eau de constitution par exemple, une eau analogue à l'eau de constitution des sels et à la faveur de quoi, surtout quand la chaleur est son auxiliaire, il peut alors s'insinuer, par une sorte d'osmose, au travers des pores ainsi créées par lui, jusqu'aux régions centrales encores vierges de ses atteintes. Cette explication nous paraît aussi satisfaisante, sinon plus, que l'hypothèse des combinaisons protéiques dissociées ou décomposées par l'alcool. Les deux explications combinées n'auraient, d'ailleurs, rien d'invraisemblable.

En effet, nos propres expériences et celles de différents auteurs confirment l'hypothèse de la miscibilité, sans toutefois anéantir l'autre, mais elles fortifient celle-là sans apporter la moindre

force nouvelle à celle-ci qui, d'autre part, n'est pas sans valeur, d'après Grigaut.

Si la première est vraie, tout solvant des graisses, avide ou simplement miscible à l'eau, sera supérieur comme capacité d'épuisement aux liquides non miscibles. Ceci est à peu près en accord avec les données de Kumagawa et Suto.

Il suffit de se reporter au tableau (*) des forces d'extraction des divers solvants soumis aux expériences de Kumagawa et Suto pour constater qu'à part le chloroforme et l'éther acétique les autres sont rangés de telle sorte que les miscibles à l'eau viennent les premiers.

L'exception du chloroforme et de l'éther acétique n'est pas une objection absolument sans réplique. Le premier se mélange à l'eau avec des proportions non négligeables, surtout quand la température s'élève. Peut-être son poids spécifique, notablement éloigné des autres liquides non miscibles, n'est-il pas non plus étranger à son activité supérieure. Quant au second, son point d'ébullition 77° est presque aussi élevé que celui de l'alcool.

Henri Iscovesco. — Une note de cet auteur parue in Soc. de Biologie (81) conteste à l'éther la capacité d'extraire toute la cholestérine d'un sérum soumis à la saponification, même intensive. Iscovesco assure qu'une partie est retenue par les savons formés : « C'est pour cette raison, dit-il, que mon » sérum saponifié et extrait par l'éther est ensuite acidifié » avec de l'acide chlorhydrique. On décompose ainsi les com- » plexes savonneux; les acides gras, mis en liberté, entraî- » nent en solution la totalité de la cholestérine ».

Iscovesco continue ensuite en appliquant la méthode de Kumagawa et Suto.

Les assertions d'Iscovesco, concernant l'action des savons sur la cholestérine déjà également mentionnée par d'autres (**) atteignent-elles l'exactitude de la méthode de Grigaut? Avec Grigaut, nous répondons par la négative. Cependant Iscovesco n'affirme rien

(*) Voir page 81.

(81) N° 7, 23 février 1912.

(**) D'après Wagner, le savon dissout la cholestérine, et Gobley déjà longtemps auparavant s'était demandé si la cholestérine n'était pas dissoute dans le sang à la faveur des savons. Pour les autres auteurs, voir notre Historique.

qu'il n'ait constaté, mais il l'a fait dans des conditions spéciales auxquelles échappent les méthodes de saponification directe de Kumagawa-Suto et Grigaut. A propos de notre méthode nous aurons à revenir sur ces questions.

Morcellement des différents lipoïdes constitutifs des organes. Technique générale par Iscovesco (82). — Ce morcellement est basé sur l'emploi successif des solvants. Les épuisements au moyen de ces fluides sont effectués par l'intermédiaire du Soxhlet, par conséquent les substances dissoutes sont exposées à la chaleur, si faible soit-elle, pendant un temps considérable, puisque l'auteur lui-même réclame *au moins* 40 heures d'extraction pour l'éther seul.

Pouvons-nous assurer qu'aucune altération, oxydation ou autre n'interviennent pas au cours d'une opération aussi longue portant sur des substances aussi fragiles? Est-ce un mal nécessaire, conséquence de notre impuissance à procéder autrement? Nous ne le pensons pas. Nous pensons, au contraire, qu'il est possible de se passer du Soxhlet y compris, naturellement, de sa modification imaginée par Kumagawa et Suto, à laquelle on peut adresser le même reproche. Il suffirait, au lieu de ces appareils où la matière périodiquement se concentre à la chaleur, de lui en substituer un autre composé de deux ballons au lieu d'un. Le premier, amovible, recevrait la matière dissoute, dont on évaporerait le solvant à froid dans le vide ou dans une atmosphère neutre et le condenserait à l'intérieur du second ballon, inamovible, refroidi à une température inférieure au premier, dominant le réfrigérant condenseur et communiquant avec lui. Quant au cylindre où serait placée la substance à épuiser, il pourrait être chauffé à une température déterminée, à la vapeur d'eau entre autres moyens. Nous reconnaissons qu'en général un tel appareil n'est pas nécessaire, particulièrement en ce qui concerne l'extraction des hémoliposes, pour lesquelles, grâce à l'emploi de l'alcool, l'appareil de Kumagawa et Suto est tout à fait recommandable.

Iscovesco applique sa méthode de morcellement à la préparation des lipoïdes des stroma globulaires du sang (83) :

« Le sang défibriné est centrifugé. Les globules séparés et » lavés trois fois sont hémolysés à l'éther. Après agitation à » l'éther, presque tous les stromas agglutinés et l'éther s'ac- » cumulent à la surface. L'éther s'évapore et, à la surface de

(82) Iscovesco. *Soc. de Biol.* n° 20, 7 juin 1912.
(83) Iscovesco. *Soc. de Biol.* n° 21 14 juin 1912.

» l'hémoglobine, il se forme une véritable croûte formée par » les stromas agglutinés. On répète cette agitation à l'éther » deux ou trois fois. Les croûtes sont réunies, mises dans » l'alcool, puis rapidement desséchées. »

Iscovesco dit lui-même qu'on ne peut considérer sa méthode comme quantitative, mais il la donne comme capable de préparer « *la plus grande quantité possible* de lipoïdes non « altérés, leur morcellement et l'étude systématique de leurs « propriétés physiologiques .»

Qu'encore Iscovesco se place à un point de vue surtout physiologique qui n'est pas le nôtre, puisqu'il est exclusivement chimique, nous n'avons pas crû devoir refuser ici une place à ses travaux importants qui, par quelque côté, s'apparentent à la chimie.

Grimbert et Laudat. — Tous les travaux récents décrits jusqu'ici, quand ils se plaçaient au point de vue pathologique, prenaient comme objet essentiel de leurs investigations la cholestérine et. incidemment, les acides lipoïques, dont le rôle a été moins bien défini.

Voici une méthode qui se propose en plus le dosage des lipoïdes phosphorés. On ne voit pas pourquoi la cholestérine jouerait seule dans l'organisme, et particulièrement dans le sang, un rôle biologique important. Les cliniciens ont concentré sur elle l'attention des chimistes. Cette attention se dissociera quand quelque autre lipose la requerra à son tour, soit par les mêmes moyens, soit sous un autre prétexte, dont l'importance ne sera probablement pas moindre. L'équilibre bio-dynamique de la lécithine en particulier doit se trouver sous la dépendance de conditions physiologiques ou pathologiques qui mériteraient une étude soignée, spécialement dans le sang. De nombreuses publications viennent à l'appui de cette manière de voir. On a mis en évidence l'influence de la lécithine sur le développement physiologique de végétaux et d'animaux. On a étudié de près ses propriétés thérapeutiques au cours d'un certain nombre de processus morbides. Les conclusions des nombreux auteurs furent concordantes et d'accord pour attribuer à ce produit biologique une activité incontestable à la fois dans les domaines de la Physiologie et de la Pathologie.

L'intérêt de son étude hématologique paraît évident. Il faut la doser, elle et ses complexes, si on arrive à les mettre en évidence dans le sang normal et le sang malade. Etablir ses connexions quantitatives avec l'âge, le sexe, l'alimentation, l'examiner en la considérant comme symptôme et en la considérant aussi comme cause peut-être. En un mot, faire pour elle ce qui a été fait pour la cholestérine dont la fortune, quoique d'une origine différente, ne saurait lui être particulière.

Dès le début de nos recherches, en février 1912, nous avons pensé ainsi. Nous les avons donc orientées en vue d'obtenir un procédé capable d'assurer l'extraction complète et le dosage précis et pratique, non seulement de la cholestérine, mais encore des lipoïdes phosphorés et des lipoïnes. Le désir d'établir une bibliographie étendue du passé nous à obligé seul à retarder la publication de notre méthode.

Comme nous, d'autres chercheurs n'avaient pas été sans songer au parallélisme possible des différents lipoïdes au point de vue spécial que nous venons de développer. Aux Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences du 11 novembre 1912, paraît une note de MM. L. Grimbert et M. Laudat « Sur le dosage des lipoïdes dans le sérum sanguin ».

Ces auteurs appliquent la méthode à l'alcool de Kumagawa et Suto, — elle-même, comme nous l'avons mis en évidence, reproduction de méthodes antérieures, — mais ils substituent, à l'exemple de Hoppe Seyler (84) l'acide azotique à l'acide chlorhydrique dans le but de doser en plus les lipoïdes phosphorés, dont ils calculent à part les acides lipoïques, chose qui n'avait pas été faite par Kumagawa et Suto.

Par conséquent, le travail de Grimbert et Laudat, tout en restant aussi parfait dans l'exécution que celui de Kumagawa et Suto, le complète. C'est pourquoi nous l'avons adopté comme type de comparaison, au cours de l'établissement de notre méthode.

Nous devons donc au lecteur qui voudra nous suivre de reproduire ici *in extenso* la technique de Grimbert et Laudat :

« A 20 centimètres cubes de sérum on ajoute 100 centi-
» mètres cubes d'alcool à 95° pour disloquer les combinaisons
» protéiques. Après un contact de 12 heures, on épuise à
» chaud le précipité par une nouvelle quantité d'alcool au
» moyen de l'appareil de Kumagava et Suto (nous nous
» sommes assurés que le résidu de ce traitement ne donne
» plus rien, même après saponification à la soude). Les
» liquides alcooliques sont réduits à un faible volume par
» distillation, et le résidu, desséché à la température de 50°,
» est épuisé par l'éther anhydre. La solution éthérée, filtrée
» sur de l'amiante et évaporée, laisse un résidu que l'on pèse
» à titre de renseignement et qui renferme à l'état brut la
» totalité des graisses neutres, des acides gras préexistants,
» des lipoïdes phosphorés ou non de la cholestérine.

(84) Voir p. 68-69.

Saponification. — L'extrait est chauffé ensuite pendant » 3 heures au bain-marie dans un ballon muni d'un réfri- » gérant ascendant avec de la potasse alcoolique N/5 (50 cen- » timètres cubes de KOH N/5 par 0 gr. 20 d'extrait éthéré). » L'alcool chassé, on reprend la masse des savons par de » l'eau chaude et, après avoir mis les acides gras en liberté » par addition d'acide azotique dilué, on épuise le tout à deux » reprises par de l'éther. La couche aqueuse (A) est soutirée » et mise à part pour y doser le phosphore provenant de la » décomposition des lipoïdes phosphorés et la solution éthé- » rée est évaporée. Le nouvel extrait, maintenu à l'étuve à » 50° pendant une heure, est repris par de l'éther anhydre; la » solution éthérée filtrée sur de l'amiante est évaporée et le » résidu desséché à l'étuve pendant 4 à 5 heures, pour insolu- » biliser les pigments. Il ne reste plus qu'à reprendre le » résidu par l'éther de pétrole qui laisse, après évaporation » et dessiccation à 50°, un mélange d'acides gras et de choles- » térine dont on détermine le poids (B).

« *Dosage de la cholestérine.* — Ce dernier, traité par la » méthode Kumagawa (*Biochemische Zeitschrift*, t. VIII, » p. 212,1908) donne la cholestérine pure que l'on pèse après » dessiccation. En retranchant le poids trouvé de (B) on » obtient celui des acides gras totaux (C).

« *Dosage des lipoïdes phosphorés.* — Le liquide aqueux » (A) est évaporé au bain-marie dans un large creuset de » Saxe, puis calciné modérément. La quantité d'alcali intro- » duite pour saponifier et l'acide azotique ajouté ensuite, suf- » fisent pour fixer le phosphore et aider à la destruction » complète de la matière organique. On reprend par une faible » quantité d'eau acidulée par l'acide azotique, on filtre et l'on » reçoit le filtrat dans un tube à centrifuger de 50 centimètres » cubes de capacité. On ajoute un grand excès de réactif » molybdique, on laisse en repos pendant 2 heures (Villiers, » *Comptes rendus*, t. 116,1893, p. 990), puis à l'étuve à 40° » pendant 4 heures et l'on centrifuge; on décante, on lave » d'abord avec de l'eau contenant 5 p. 100 du réactif molyb- » dique, puis avec quelques centimètres cubes d'eau distillée; » on décante de nouveau et l'on sèche le tube et son contenu » à 100° jusqu'à poids constant. Le poids de phosphomo- » lybdate divisé par 2,3 donne le poids de lipoïdes phospho-

» rés exprimés en lécithine distéarique contenu dans la prise » d'essai.

« Comme vérification, une prise d'essai de phosphate » alcalin représentant 0,002 de $P^2 O^5$ nous a donné dans qua- » tre opérations successives : 0,0540 — 0,0538 — 0,0550 — » 0,0540 de phosphomolybdate, soit : 0,00201 — 0,00205 — » 0,00200 — 0,00201 de $P^2 O^5$. Une prise d'essai de lécithine » de 0,010, après calcination en milieu alcalin, nous a donné : » 0,0230 et 0,0235 de phosphomolybdate, soit : 0,0100 et » 0,0102 de lécithine. La même dose, préalablement sapo- » nifiée, a donné : 0,0214 et 0,0212 de phosphomolybdate, » correspondant à 0,00930 et 0,00923 de lécithine, chiffres un » peu plus faibles, comme on pouvait s'y attendre, étant » donné le supplément de manipulations imposées.

« *Evaluation des acides gras.* — Si du total des acides » gras obtenus en (C), on retranche ceux qui proviennent de » la saponification des éthers de la cholestérine (exprimée en » acide oléique) et de la saponification de la lécithine (expri- » més en acide stéarique), le reste peut être attribué aux acides » gras provenant de la saponification des graisses et aux » acides gras préexistant à l'état libre dans le sérum. Pour » les besoins de la clinique, on peut se contenter de les comp- » ter ensemble. En supposant que la cholestérine se trouve » tout entière dans le sérum à l'état d'éther oléique, ce qui » est généralement admis (Hurthle et Hepner), il suffit de » multiplier le poids de cholestérine pure trouvé par le facteur » 0,73 pour avoir le poids d'acide oléique correspondant. De » même, le poids de lécithine multiplié par 0,689 donne la » quantité d'acide stéarique qui en dérive ». .

Cette note fut bientôt suivie d'une nouvelle note des mêmes auteurs parue *in Soc. de Biologie* (85). A l'effet d'établir un départ entre la cholestérine libre et la cholestérine combinée, Grimbert et Laudat, à l'instar de Mayer et Schaeffer, font appel à la propriété de la digitonine de se combiner à la cholestérine libre sans toucher à ses éthers.

Leurs premiers dosages, en effet, étaient calculés en supposant toute la cholestérine à l'état d'éther oléique et palmitique, d'après les idées de Hurthle et Hepner qu'ils avaient adoptées. A la suite de Windaus, M. Fraser et S. Gardner (86), Grimbert et Laudat

(85) N° 15, 2 mai 1913.
(86) *Loc. cit.* p. 83.

avec la plupart des savants, considèrent comme certaine l'existence de la cholestérine libre et en effectuent le dosage par application de la technique Windaus. Après avoir fait l'extrait alcoolique à 50° et l'extrait d'éther anhydre, ils pèsent ce dernier et le dissolvent à chaud dans 50 fois son poids d'alcool absolu.

« Le liquide porté à l'ébullition est additionné d'une solu-
» tion bouillante de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool absolu.
» Pour la plupart des sérums humains, il suffit de mettre un
» poids de digitonine égal à la moitié de celui de l'extrait;
» pour le sérum des ictériques, il peut être nécessaire d'aug-
» menter sensiblement cette quantité. (Nous nous sommes
» assurés qu'un excès de digitonine ne faussait pas les résul-
» tats). Dans l'exemple que nous avons choisi, nous ajoute-
» rons donc 10 centimètres cubes de solution de digitonine à
» 1 p. 100. En tenant compte de l'évaporation, le volume
» total est d'environ 18 centimètres cubes. Pour déterminer
» la précipitation du complexe, il faut faire tomber le titre
» alcoolique du mélange à 95 degrés, en ajoutant de l'eau
» distillée.

« Dans notre cas, nous verserons donc 1 cent. cube 5 d'eau
» distillée. Le complexe se précipite aussitôt. On le laisse
» déposer pendant une heure et on sépare le précipité par
» centrifugation dans un tube taré; on le lave à l'alcool à
» 95 degrés et à l'éther, on le sèche et on le pèse. On
» obtient la quantité de cholestérine libre en multipliant par
» le facteur 0,2431 le poids du complexe obtenu.

« Les solutions alcooliques réunies sont concentrées à un
» faible volume et versées après refroidissement dans un
» grand excès d'éther sulfurique, auquel on ajoute l'éther de
» lavage du complexe. La digitonine insoluble se précipite,
» les graisses et les lipoïdes restent en solution. (L'appari-
» tion de ce précipité prouve que la quantité de digitonine
» employée était suffisante pour fixer toute la cholestérine
« libre). On sépare la digitonine par centrifugation et on la
» lave à l'éther. Les solutions éthérées réunies sont distillées
» et le résidu repris par l'alcool est saponifié.

« *Saponification.* — La solution est chauffée ensuite pen-
» dant trois heures au bain-marie dans un ballon muni d'un
» réfrigérant ascendant avec de la potasse alcoolique 2,5
» (25 centimètres cubes de potasse par 0 gr. 20 d'extrait).

» L'alcool étant chassé, on reprend le résidu par de l'eau » chaude et, après avoir mis les acides gras en liberté par addi- » tion d'acide azotique dilué, on épuise le tout à deux reprises » par l'éther. La couche aqueuse (A) est soutirée et mise à » part pour y doser le phosphore provenant de la décompo- » sition des lipoïdes phosphorés et la solution éthérée lavée » avec de l'eau distillée est évaporée. Le nouvel extrait main- » tenu à l'étuve à 50 degrés pendant une heure est repris par » l'éther anhydre; la solution éthérée, centrifugée et décantée, » est évaporée.

« Le résidu est séché à l'étuve à 50 degrés pendant quatre » à cinq heures; on le reprend par de l'éther de pétrole, qui » laisse après évaporation et dessiccation à 50 degrés, un » mélange d'acides gras et de cholestérine, dont on déter- » mine le poids (B).

« *Dosage de la cholestérine libérée.* — La séparation de la » cholestérine peut être obtenue par la méthode de Kumagawa » (*Biochemische Zeitschrift*, t. VIII, p. 212, 1908); mais il » nous a semblé préférable de suivre pour la cholestérine » libérée, la méthode de Windaus, suivant le procédé que » nous avons indiqué pour la cholestérine libre. En retran- » chant le poids trouvé de (B) on obtient celui des acides » gras totaux (C.)

« Rappelons que MM. Mayer et Schaeffer ont proposé l'an » dernier de combiner la méthode de Kumagawa et celle de » Windaus pour le dosage des acides gras et de la cholesté- » rine totale.

« *Dosage des lipoïdes phosphorés.* — Nous n'avons pas » apporté de modification à la technique indiquée dans notre » note précédente.

« *Evaluation des acides gras.* — Si, du total des acides » gras obtenus en (C), on retranche ceux qui proviennent de » la saponification des éthers de la cholestérine (exprimés en » acide oléique) et de la saponification de la lécithine » (exprimés en acide stéarique), le reste revient aux acides » gras préexistant à l'état libre ou à l'état de graisses neutres » dans le sérum. »

On remarquera que dans leurs calculs des acides lipoïques, des lipoïnes et des lipoïdes, Grimbert et Laudat sont obligés à des hypothèses qui ne sont que rien moins prouvées. La cholestérine

combinée le serait tout entière à l'état d'éther oléique, après avoir été méconnue a l'état de liberté (voir première note) la lécithine serait uniquement stéarique.

Sans doute il y a pour l'esprit une satisfaction à passer au-delà des faits, à les compléter grâce à l'aide d'un calcul de probabilité et à s'affranchir ainsi de ceux encore inconnus qui seraient nécessaires pour aboutir à la certitude. Cette impatience a pour excuse la psychique jouissance d'une gymnastique spéculative, hostile aux lacunes non comblées par des faits nouveaux attendus, et qu'on ne veut pas attendre ; elle a encore pour excuse, et c'est la meilleure, que les conséquences hypothétiques appellent souvent et plus rapidement ces faits nouveaux nécessaires et que leurs résultats provisoires ont néanmoins parfois un côté pratique susceptible d'utilisation immédiate.

Les calculs de Grimbert et Laudat cependant, peuvent avoir une utilité pratique, en particulier quand il s'agit d'établir des comparaisons de chiffres en séries.

Au point de vue clinique spécialement, où les auteurs ont voulu surtout se placer, à leurs propres dires, les avantages qu'il peut y avoir, en l'état actuel des choses, à comparer les teneurs hématiques en acides lipoïques libres, lipoïnes, etc., déduits de certaines hypothèse, ne sont peut-être pas dépourvus d'intéret, mais notons qu'il était possible de serrer encore de plus près la vérité, en réduisant le nombre des inconnues du problème, par le dosage supplémentaire de la glycérine libre et combinée.

Widal, André Weil et Laudat ont largement appliqué la méthode de Grimbert et Laudat, mais en la restreignant aux déterminations purement expérimentales. Ils en ont tiré néanmoins des conclusions dignes de remarque. La note (87) à laquelle nous renvoyons le lecteur ne conserve et ne fait état que des nombres tirés des faits expérimentaux, (lipémie, cholestérine libre et totale, combinée déduite) exception faite toutefois pour la lécithine également dosée, qui est supposée exclusivement stéarique. Mais pour la lécithine, il faut le dire, les mêmes inconvénients ne se présentent pas. Les poids moléculaires des lécithines signalées à l'état naturel, stéarique, palmitique, oléique, ne s'écartent pas beaucoup les uns des autres et, de plus, la première, de l'avis général, prédomine largement. Cependant, malgré tout, il n'a pas été démontré que la ou les lécithines fussent dans le sang les seuls représentants des lipoïdes phosphorés. S'il en était autrement, des conséquences plus sérieuses, on le prévoit, pourraient être envisagées.

Quant à nous, nous croyons plus sage de ne point céder aux hypothèses trop séduisantes. Elles sont encore prématurées et leur adoption nous obligerait à envisager des déductions d'ordre plutôt

(87) Widal, André Weil et Laudat. *Etude comparative du taux de la cholestérine libre et de ses éthers dans le sérum sanguin.* (*Soc. de Biol.* N°. 15, 2 mai 1913, p. 882.)

théorique, du reste, intéressantes tout de même, mais étrangères au but que nous poursuivons.

Conclusions concernant la période contemporaine.

Pendant toute la période que nous avons appelée *moderne*, on s'attachait moins à la rigueur des dosages qu'aux déterminations qualitatives. C'était logique. Le travail était encore tout spéculatif. Les pesées n'apparaissaient pas comme conséquentes en déductions pratiques physiologiques, pathologiques ou thérapeutiques. Il fallait avant tout s'attacher à déterminer les *formes* sous lesquelles les lipoïnes et les lipoïdes se trouvaient dans le sang total, le plasma ou les éléments figurés. Les acides gras, les acides lipoïques s'y rencontrent-ils à l'état libre ou sous forme de lipoïnes (matières grasses neutres), ou sous forme de savons, ou bien existe-t-il une association de ces formes en proportions variables? De même la cholestérine est-elle libre ou combinée, ou sous ces deux formes? Même question pour la lécithine; même question pour d'autres lipoïdes si on les avait mis en évidence.

Malgré la maîtrise des savants qui ont attaché leur nom à ces recherches délicates, on ne peut dire à l'heure actuelle qu'il y ait réponses formelles à toutes ces questions. Beaucoup d'entre elles sont encore discutées. C'est pourquoi les chimistes qui ont voulu faire œuvre pratique se sont surtout attachés à quantifier la totalité de chaque principe immédiat rentrant dans la catégorie lipoïne ou lipoïde, sans essayer de déterminer en poids leurs formes de combinaisons encore sujettes à interprétations indécises.

Connaître la nature des combinaisons sous lesquelles les lipoïnes et lipoïdes sont présents dans le milieu sanguin, est un sujet assez difficile pour être toujours en cours d'étude. Il en est un autre qui paraît avoir fait plus de chemin. Nous voulons parler de l'origine et de la destinée de ces substances. Leur origine, semble-t-il démontré, est double : externe ou alimentaire et interne, c'est-à-dire résultant d'une élaboration d'organites internes, comme les surrénales, les ovaires, etc. Quant au mécanisme de ces élaborations, il

demeure en grande partie tout à fait obscur, surtout en ce qui concerne l'autogénèse organique.

L'étude de la destinée des lipoïnes et lipoïdes réclame une subdivision : reconnaître le rôle joué par ces principes et leurs combinaisons au sein du milieu sanguin lui-même; établir ensuite leur rôle par l'intermédiaire du sang vis-à-vis de l'économie; enfin quel sort ultérieur leur est réservé : comment ils se détruisent ou sont rejetés au dehors.

L'expérimentation physiologique a donné des explications satisfaisantes ou définitives relativement aux lipoïnes. On peut dire qu'aidée par la chimie, la pathologie et l'observation clinique, elle est en voie de dissiper les voiles dont s'entouraient la genèse et le métabolisme des lipoïdes au sein de l'organisme. Nous nous sommes appesanti, dans notre Introduction, sur ces points particuliers. Qu'encore ils ne soient pas spécialement inscrits dans notre programme, ils méritaient mieux qu'une mention.

La période contemporaine a rayé de la liste des hémoliposes quelques substances reconnues inexistantes comme principes définis. Elle a conservé les lipoïnes (stéarine, palmitine, oléine) et les acides lipoïques correspondants, la cholestérine qu'elle considère à l'état libre et combiné (éthers, protéo-cholestérides), enfin la lécithine sur les états chimiques de laquelle on n'est pas encore absolument fixé.

Une vision d'ensemble sur le tableau général des procédés mis en œuvre depuis les débuts de l'histoire des liposes hématiques jusqu'à nos jours, en vue de l'extraction et du dosage des liposes sanguines, nous apprend qu'on peut réunir ces procédés en deux groupes distincts :

1° Traitement du sang primitivement desséché;

2° Traitement du sang frais.

Pendant les deux premières périodes historiques que nous avons considérées sous les noms de période ancienne et de période moderne, ces deux sortes de traitement s'appliquaient à l'analyse générale du sang. L'examen de cette humeur au seul point de vue des liposes appartient à l'époque contemporaine, où son intérêt est apparu sous un jour nouveau.

Le premier mode de traitement était effectué dans le but d'éliminer l'eau constitutionnelle. Après quoi on pouvait

admettre que les solvants agiraient en conservant toute leur puissance d'action. Or, il n'en est rien. Nous en avons mis les causes probables en lumière.

Un autre défaut signalé de la dessiccation préalable se traduit par des pertes en principes gras volatils. Ceci demeurerait indifférent si, ne recherchant pas leur dosage, aucune perturbation n'intéressait les acides lipoïques. Or, nous savons ces derniers altérés dans ces conditions. Cet inconvénient peut être atténué, sans doute, par un assèchement à froid à la pression ambiante ou réduite. Mais c'est là un palliatif qu'il convient généralement de mettre de côté.

Nous restons donc en présence du traitement immédiat du sang frais. Ceci demeure sans objections possibles. Ces dernières ne peuvent atteindre que les techniques consécutives. Nous les avons discutées chaque fois qu'elles se sont présentées.

Presque toutes s'accordent dans le choix de l'alcool pour précipiter le sang ou du moins ses protéines et en séparer les liposes. Les expériences comparatives de Kumagawa et Suto sur les poudres de tissus desséchés, reprises et appliquées au sang par Shimidzu ont définitivement, semble-t-il, consacré l'alcool comme agent de choix.

Les liposes rassemblées par l'alcool et par l'éther sont isolées en leurs principes immédiats par une heureuse combinaison et succession de l'eau pour dissoudre les savons, des acides minéraux pour libérer les acides gras, de l'éther d'alcool ou de pétrole pour recueillir les lipoïnes et les lipoïdes. Entre temps, une judicieuse saponification permet, en respectant la cholestérine, de la redissoudre inaltérée dans un dissolvant approprié, de la peser pure ou sous forme d'une combinaison; en dédoublant la lécithine d'en déduire la proportion au moyen d'une détermination quantitative de son phosphore.

Au lieu d'envisager la question à un point de vue général, certains savants ont restreint leurs visées à un composé déterminé.

Dans ces tous derniers temps, la cholestérine, on peut le dire, a concentré sur elle de nombreux efforts. Les discussions dont furent le sujet et l'occasion les liposes, à propos des traitements de la matière sèche ou fraîche et des modes

opératoires consécutifs, ont été étendues jusqu'à la cholestérine. Elle peut et doit devenir alors le point de départ de nouvelles études des composés lipoïques et de certains de leurs complexes sur lesquels règne encore l'obscurité. C'est ainsi que tout le phosphore de l'extrait éthéré du sang est supposé sous forme de lécithine et de lécithine stéarique : nous n'en avons pas la démonstration. De plus, nous n'obtenons qu'une approximation grossière des proportions des éthers cholestériques. Enfin, la nature de l'insaponifiable est loin d'être complètement élucidée en son intégrité et laisse malgré tout quelques doutes sur la pureté chimique absolue de la cholestérine obtenue. Le mot *insaponifiable* généralement substitué au mot *cholestérine* suffirait à nous le prouver.

A la vérité il n'est pas invraisemblable de tenir le sang pour véhiculer toutes les liposes animales et leurs complexes actuellement connus. Une investigation complète portant à tour de rôle sur les hématies, le sérum, le plasma, les leucocytes, etc.. devrait donc rechercher et doser :

Parmi les lipoïnes : les lipoïnes neutres, leurs produits de dédoublement : acides lipoïques et glycérine libre, les sels correspondants de ces acides ou savons. Enfin les complexes possibles de ces substances avec les autres constituants du sang.

Parmi les lipoïdes : cholestérines, éthers et complexes (avec protéines, savons, etc.); phosphatides (lécithine, céphaline, etc.) galactophosphatides (phrénosine, etc.)

Tel est un aperçu du programme de l'avenir, qu'il faut se garder d'ailleurs d'assurer parfait. Les lacunes à combler sont donc encore nombreuses. Au moment d'entrer dans l'exposé de nos travaux personnels, nous devons dire que nous n'avons pas prétendu à en faire disparaître quelqu'une. Notre méthode a simplement l'ambition modeste de rester exacte à côté des plus estimées à ce point de vue, tout en n'étant pas plus compliquée au total et d'apporter cette supériorité incontestable de doser séparément chaque composé, sans faire dépendre le dosage de l'un d'entre eux du dosage de certains autres.

Mais un esprit d'une philosophie purement spéculative aurait-il présidé à son élaboration, serait-elle le fruit d'une gymnastique intellectuelle sans espoir de corollaires utiles

dans leurs applications, enfin son rendement au point de vue du mécanisme opératoire, sinon quant aux résultats, apparaîtrait-il comme même inférieur aux procédés récents similaires, conviendrait-il de la réduire au séjour illimité du laboratoire où elle naquit et dont elle croit pouvoir franchir le seuil avec le nom de *méthode nouvelle*, qu'elle pense légitimement s'attribuer?

Ce serait évidemment condamner la *recherche de chimie pure*, rayer, par exemple, de nos manuels, toutes les préparations jugées inopportunes quant à la simplicité, à la facilité, à la rapidité d'exécution et quant au rendement, et cela au profit d'une seule réunissant des avantages considérés comme réels. Ce serait, dans le domaine mathématique, n'adopter qu'une seule démonstration d'un théorème, quand tout justement l'esprit mathématique en réclame au contraire la variété. Ce serait enfin substituer à cette philosophie scientifique, éloignée souvent de tout résultat objectivement utile, parce qu'elle en est la source abondante, une science mercantile, vouée à la sécheresse et aux petits effets qu'elle se bornerait à rechercher.

Notre méthode prétendrait-elle donc uniquement au nom de *méthode nouvelle*, tout en dédaignant celui de *méthode pratique*, qu'elle prendrait tout de même place pour la discussion. Nous pensons qu'elle mérite à la fois cette double appellation. C'est pourquoi nous n'hésitons pas à la présenter au jugement des chimistes, des hématologues et plus généralement des hommes de laboratoire.

DEUXIÈME PARTIE

Sur notre méthode ou méthode Acétone-Savons d'argent.

CHAPITRE I

DES ORIGINES DE NOTRE MÉTHODE

§ 1. — Considérations générales sur le choix du principe d'une méthode rationnelle.

Si l'on cherche à se faire une idée un peu précise de la teneur du sang circulant en liposes, indépendamment de la région anatomique qui en est la source, une condition nous apparaît tout de suite comme absolument nécessaire. Il faut agir sur du sang inaltéré, donc frais, par conséquent autant que possible dès qu'il est émis hors des vaisseaux. Si l'on tient à analyser le sérum, on doit favoriser sa formation rapide et, dans tous les cas, le mettre à l'abri de modifications susceptibles de donner lieu à des changements lipométriques.

Si l'on ne peut traiter le sang aussitôt, on le conserve, par exemple, à l'intérieur d'une glacière, dans des tubes ou vases stérilisés, où il aura été reçu dès son émission. Chez l'homme on a l'habitude de ponctionner aseptiquement une veine du pli du coude et de recevoir immédiatement le liquide épanché dans des tubes ou des éprouvettes stérilisés. On peut aussi le prélever au moyen d'une seringue quand, pour une raison quelconque, il ne s'écoule spontanément qu'avec diffi-

culté. Comme il faut au moins peser des centigrammes, au 1/10e de milligramme, des produits purs à doser, on voit qu'il devient nécessaire de recueillir environ de 10 à 30 centimètres cubes de sang, chacun des produits à évaluer figurant dans le sang humain normal au taux moyen de 1 à 2 p. 100.

Pour les recherches d'ordre expérimental et la mise au point d'une technique élaborée d'abord théoriquement, il convient bien entendu de s'adresser aux animaux ou d'opérer, quand cela est possible, sur le sang d'une saignée dont le but a été thérapeutique, pendant une crise urémique par exemple.

Comme nous le verrons, nous avons établi expérimentalement notre méthode au moyen du sang des équidés et nous l'avons ensuite appliquée à l'homme.

Quels moyens le chimiste va-t-il mettre en œuvre pour extraire du sang la totalité des liposes? Essayons d'examiner comment il traitera cette question en le supposant tout à fait ignorant des travaux de ses collègues spécialistes, mais naturellement, muni des connaissances actuelles générales de la chimie des matières grasses. Il songera tout d'abord, semble-t-il, aux solvants des graisses, incapables d'en altérer la nature chimique. La plupart d'entre eux, il est vrai, sont gênés dans leur action par l'eau. Il semble donc qu'il y ait intérêt à dessécher d'abord le sang, à le pulvériser ensuite afin de multiplier les surfaces de contact. Dans un tel procédé, il y a à considérer les moyens employés pour dessécher le sang. Il paraît donc naturel d'opérer à basse température afin d'éviter les pertes et les altérations favorisées par la chaleur.

D'autre part, il convient d'agir avec une certaine rapidité dans l'intention de prévenir, moins les altérations microbiennes que l'on peut conjurer, que les altérations endogènes, autolytiques ou autres.

Si l'on opère à basse température, le vide paraît assez indiqué, mais il n'est pas sûr qu'il ne soit favorable à des altérations possibles ou à des pertes, si l'on tient à conserver même les éléments volatils, ce qui n'est pas notre objet, nous le savons.

Dans ces conditions, on peut alors avoir recours à des substances desséchantes énergiques sur lesquelles on fait inter-

venir, après coup, l'action des solvants, aussi bien que sur le sang sec lui-même.

Dans cet ordre d'idées, on peut pratiquement s'adresser à des sels minéraux neutres très avides d'eau, sans échauffement nuisible : sulfate de soude, chlorure de calcium, sulfate de cuivre anhydres. Le sulfate de soude serait particulièrement indiqué en raison de son inactivité vis-à-vis des corps gras. Il suffirait de mélanger intimement le sang avec ce sel et de l'épuiser consécutivement avec un fluide approprié. Les liquides avides d'eau eux-mêmes ne sauraient être négligés, à condition qu'ils demeurent chimiquement indifférents vis-à-vis des liposes. L'alcool, l'acétone sont dans ce cas. Mais ils sont en même temps solvants plus ou moins énergiques des graisses. On peut penser avant tout examen qu'avec l'eau, chargée elle-même des éléments solubles, ils entraîneraient au moins une fraction des graisses, en sorte qu'on se trouverait dans l'obligation de traiter les deux parties pour avoir le tout.

Se plaçant à un autre point de vue, on peut s'efforcer de débarrasser le sang de la masse prépondérante de ses produits constitutifs. Comme on sait, il s'agit des matières protéiques; par conséquent, on pourra s'adresser soit à la chaleur en présence des acides ou non, soit aux sels précipitants, soit aux liquides précipitants, parmi lesquels justement se trouvent de nombreux solvants des graisses : de ces derniers, un des plus adaptés, semble-t-il, serait l'alcool, capable à la fois de solubiliser les liposes tout en précipitant les protéines. Il y a lieu encore de prévoir, dans ces cas, comme dans les premiers, un partage inégal des corps gras entre le solvant et les albuminoïdes précipitées par lui et, par suite, un traitement particulier aux deux, pour en extraire les graisses.

L'imagination avertie et dirigée par l'éducation quotidienne du laboratoire, disciplinée par la connaissance des lois physico-chimiques, pourrait élaborer, *a priori*, d'autres procédés, quitte à les voir condamner ou corriger par l'épreuve expérimentale.

Cependant dans le choix que le chercheur est appelé à faire d'un procédé rationnel, il doit ne pas oublier que le *temps* et le *nombre* sont les meilleurs auxiliaires de la Science. Les

faits accumulés par les savants de toutes les époques sont les pierres dont elle est bâtie et d'où naissent, grâce à l'observation patiente et ingénieuse, souvent géniale, les principes et les lois qui les unissent comme un ciment. C'est une nécessité autant qu'une justice de tenir le plus grand compte des travaux de ses précurseurs. Sans eux ce serait l'impuissance, puisqu'on leur doit les premières connaissances, c'est-à-dire les outils de tout progrès. Voilà comme quoi l'expérience apportée par le temps, l'expérience acquise des autres et de soi-même, corrige les erreurs de l'imagination et la discipline vers la vérité.

§ 2. — **Sur l'extraction des liposes.**

Dès l'époque où les travailleurs occupés à l'étude du sang s'intéressent aux liposes hématiques, ils font intervenir tous les moyens connus contemporains capables de déceler leur présence, d'en examiner la nature et plus tard de les doser. Aussi l'histoire chimique des matières grasses du sang est celle des matières grasses en général, celle-ci précédant toujours de peu celle-là et même les deux se confondant si on les considère sous le rapport du temps.

C'est ainsi qu'à l'origine quelques propriétés organoleptiques et physiques trahissent la présence des graisses dans le milieu sanguin, ensuite survient l'intervention des solvants ; l'alcool et surtout l'éther permettent de les isoler avec plus ou moins de fidélité entre les mains des auteurs de la fin du VXIII^{e} siècle et du commencement du XIX^{e}. Un peu plus tard (1813-1814), un puissant instrument, la saponification, est fourni par Chevreul aux lipologues. Par l'étude attentive de l'action des alcalis sur les matières grasses, cet illustre chimiste a déterminé une éclosion de travaux, à commencer par les siens, sur la nature précise des corps gras. S'il n'a fait qu'effleurer le cas du sang, par l'étendue et la puissance de ses travaux sur les tissus en général, il a préparé et ouvert des voies nouvelles aux hématologues. Ceux-ci ont pu, dès lors, avec le plus grand profit, peu après les découvertes de Chevreul, user des procédés de la saponification pour reconnaître, isoler ou doser, avec des succès divers, les liposes du sang,

et de nos jours il n'est point une analyse de graisses, extraite du sang ou de tout autre tissu, qui ne fasse intervenir une ou plusieurs saponifications. Ainsi en témoignent les mémoires de Chevreul, de ses contemporains et de ses successeurs et tous les ouvrages parus depuis cette époque relatifs à l'analyse des matières grasses en général, des tissus et du sang en particulier.

Ces opérations aujourd'hui ont revêtu un caractère essentiellement classique, en sorte qu'au cours de leur emploi, aucun chimiste ne songe à citer ses prédécesseurs dans l'usage qu'il en fait, à moins qu'il ne veuille entreprendre œuvre d'historien, en s'attachant d'ailleurs, le plus souvent, à la simple description des faits. C'est le but que nous avons poursuivi dans la première partie de cet ouvrage, mais en le complétant par la critique et la discussion. En revanche, si la phalange des auteurs intermédiaires est négligée par le chercheur, sa pensée s'élève jusqu'au véritable créateur et initiateur de la méthode, Chevreul.

Etat du sang sur lequel doit porter l'extraction des liposes. — *A priori*, les nombres obtenus par l'analyse seront, sans nul doute, d'autant plus rapprochés des nombres réels relatifs au sang circulant, qu'il sera possible d'agir sur un sang plus fraîchement extrait des vaisseaux, puisqu'il s'agit d'un milieu vivant éminemment altérable. Cette remarque acquiert de l'intérêt surtout au point de vue clinique et physiologique. Elle en a moins au point de vue purement chimique dans l'établissement et l'étude d'une méthode. Ce qui importe alors c'est d'agir sur un même milieu capable d'entraîner des résultats comparables et pourvu aussi, toutefois, qu'aucune altération n'ait eu pour conséquence de le différencier sensiblement de son état physico-chimiste et bioplastique primitif. S'il s'agit donc du sang total, le mieux sera de le recevoir de suite, au fur et à mesure de son écoulement, dans le milieu choisi pour l'analyse, par exemple l'alcool. Le sérum, le sang défibriné, les hématies, etc., seront traités aussitôt leur obtention par les moyens les moins capables de les altérer (glacière, centrifugation, etc.).

Les considérations envisagées au début de cet exposé nous engagent encore, *a priori*, et sans autre examen, à rejeter

tout mode opératoire à partir du sang modifié, par exemple par la dessiccation, du moins si nos résultats ambitionnent de représenter les proportions vitales des hématoliposes. A l'appui de cette manière de voir, interviennent les données expérimentales de divers auteurs, parmi lesquels Shimidzu. La dessiccation entraîne des pertes en matières grasses par la volatilisation d'abord. Cela est d'observation courante. Chacun sait que la vapeur condensée à la surface d'une assiette froide placée au-dessus d'une viande rôtie, prend à la vue un aspect gras, dont la nature grasse, sans aller plus loin, est confirmée par le toucher. Les anciens auteurs, en distillant du sang, avaient reconnu ce phénomène bien avant même Denis qui, distillant du sang au bain-marie, s'exprime ainsi : « l'intérieur » des récipients et du col des cornues paraissait comme s'il eût » été frotté avec un corps gras. Un lavage à la potasse, à l'al- » cool ou à l'éther détruisait promptement cette propriété. Elle » provenait donc réellement de la présence d'un corps gras ».

Nous avons fréquemment fait les mêmes observations, même vers 50°, en opérant dans le vide la distillation de filtrats d'alcool provenant de lavages du sang par ce liquide. Celui-ci présente une réaction acide, surtout vers la fin de son évaporation, quand il n'en reste plus qu'une petite quantité. On peut noter des remarques identiques avec d'autres solvants.

Il y a donc normalement dans le sang des acides gras volatils : en tout cas il est difficile d'admettre qu'ils aient pour origine une altération de cette humeur sous l'influence des réactifs et de la chaleur. On peut prévoir une méthode de dosage dans le distillat, comme on le fait pour les acides gras volatils des matières grasses en général, acides volatils entraînés dans ces cas par un courant de vapeur d'eau.

Opérant en grand sur de fortes quantités d'organes frais pulpés, desséchés dans le vide sulfurique au moyen d'une puissante pompe, genre Carré, nous avons recueilli une certaine quantité de corps gras condensés à la surface de l'acide sulfurique et bien que la dessiccation soit effectuée complètement à froid et pendant le temps le plus long à une température inférieure à 0, voisine souvent de 10°, en raison du dégagement de la seule chaleur latente de volatilisation. Ces acides gras sont donc volatils à froid dans le vide et entraînés avec la vapeur d'eau. La dessiccation, quel que soit son mode,

entraîne donc des pertes en acides gras. C'est un fait de longtemps connu.

En est-il de même touchant les acides lipoïques, seuls intéressants pour nous? Ici le mode de dessiccation intervient d'une manière notable. Ce qui est à craindre principalement c'est l'oxydation, bien notée de tous les analystes. Divers auteurs ont indiqué les précautions à prendre pour l'éviter. Parmi les contemporains, Shimidzu signale les bons effets du vide de la pompe à mercure (88), mais sans en recommander l'usage en raison de son peu de commodité. Mottram intervient lui aussi sur le même sujet (89). Evidemment, il faut, d'une manière générale, éviter l'action de l'air et on peut donc, en dehors du vide, concevoir un séchage au sein d'un gaz inerte à pression réduite ou non. Nous reviendrons sur cette question à propos du séchage des acides lipoïques isolés.

Quelques-uns ont proposé de mouiller largement d'alcool la matière à sécher et de la soumettre dans ces conditions à la chaleur du bain-marie. Ainsi ont fait Kumagawa et Suto. Shimidzu a montré que cette manière d'opérer n'offrait quelque garantie à l'égard des acides lipoïques, qu'à la condition d'agir rapidement et sur une faible quantité de substance : les cas les plus favorables réduisent alors la perte à moins de 1 p. 100 (90). Ces expériences concernent divers tissus, le sang excepté.

En résumé, le mode de dessiccation a une influence considérable sur la protection des matières grasses : pertes en substances volatiles, pertes en substances fixes.

Il faut maintenant considérer, en outre, la facilité d'extraction. Quel est l'état physique le plus favorable à l'extraction des graisses pour une méthode donnée? Si tous les auteurs s'accordent aujourd'hui pour juger que la matière sèche offre un état peu propice à l'extraction, il n'est pas douteux non plus que le système adopté doit exercer un rôle. Mais quel que soit ce système, il sera sans intérêt si, même étant capable d'extraction complète, une partie des graisses est auparavant atteinte dans son intégrité. Sur ce point nous

88. Shimidzu. — *Biochemische Zeitschrift*. — *Ein Beitrag zur Kumagawa-Sutoschen Fettbestimmungs-méthode*, p. 271, 2° et 272, 6°.

(89) Mottram. *J. Of. P.* XL, 122-134.

(90) *Loc. cit.* p. 271 1°, article cité 88.

nous en tiendrons aux conclusions de Shimidzu, énoncées d'ailleurs bien avant lui, mais non tirées d'expériences aussi précises : « Quand il s'agit de doser les graisses d'un tissu » il faut agir sur le tissu frais et non préalablement desséché, » sans quoi on encourt deux sortes d'erreurs, celles qui pro- » viennent de la perte en matières grasses du fait de la des- » siccation, perte variable d'ailleurs avec le mode de séchage, » et celles qui proviennent de la difficulté accrue de l'ex- » traction sur le tissu desséché. Ces deux sortes d'erreurs » s'ajoutent donc. »

Emploi de l'alcool dans l'extraction des liposes. — Cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas de méthode capable d'extraire la totalité des graisses d'un tissu desséché, mais alors de ce dosage exact on ne peut déduire sans erreur par défaut celui qui se rapporte au tissu frais.

Ainsi en est-il de la méthode de *saponification directe* de Kumagawa et Suto, renouvelée de la méthode de Liebermann et Szekely, et aussi de la méthode à l'alcool combiné à la saponification de l'extrait, classique depuis longtemps, mais revue dans ses détails par les mêmes Kumagawa et Suto.

Ces deux méthodes, rendues exactes par eux, en ce qui concerne leur application aux poudres tissulaires sèches, ont le mérite, d'après Shimidzu, de l'être généralement pour les tissus frais. Le sang, d'après cet auteur, ferait exception et seule la méthode à l'alcool lui serait applicable. Nous reviendrons sur ces méthodes, au moment de leur comparer la nôtre.

De telles conclusions nous imposent de retirer tout crédit aux résultats des procédés antérieurs, du moins aux résultats expérimentaux tirés de la matière sèche et rattachés par le calcul à la matière fraîche.

Il y a plus, Kumagawa et Suto, revisant les nombres de leurs devanciers immédiats, paraissent avoir démontré leur inexactitude, même quand — déduits de la matière sèche, — ils ne sont pas étendus à la matière primitive.

Ainsi furent repris les travaux des auteurs suivants, dont les procédés d'extraction des graisses des tissus desséchés et réduits en poudre furent démontrés insuffisants : Rosenfeld (91) avec son épuisement alternatif à l'alcool et au chlo-

(91) *Loc. cit.* p. 78.

roforme; F. Bogdanow (92), O. Frank (93), avec leur méthode à l'alcool; Dormeyer (94), Voit (95), avec l'emploi d'une digestion préalable des tissus, suivie d'une extraction éthérée.

De tout cet ensemble de travaux comparatifs considérables, Kumagawa et Suto concluent par l'adoption de deux méthodes seules douées, d'après eux, d'une énergie suffisante pour extraire des poudres sèches tissulaires la totalité des graisses. Ces méthodes, décrites dans la 1re partie, nous les rappelons ici :

1° *La saponification directe* des tissus soumis à l'action d'une solution sodique, à la température du bain-marie d'eau bouillante, méthode imaginée par Liebermann et Szekely. Kumagawa et Suto, en précisant les conditions optima de son application, en firent une méthode rigoureuse pour le dosage des acides lipoïques; Grigaut, en élevant encore la température à 110-120° grâce à l'emploi de l'autoclave, la rendit encore plus rapide pour la détermination de la cholestérine totale. Il conviendrait, — disons-le en passant, — de rechercher si l'autoclave rendrait les mêmes services touchant les acides gras. Nous avons fait à ce sujet un nombre insuffisant d'expériences pour nous permettre d'en publier les résultats.

2° *L'extraction au moyen de l'alcool fort.* — Cette méthode est déjà très ancienne. Il suffit de se reporter à la première partie de cet ouvrage pour en être convaincu.

Cette méthode d'extraction par l'alcool, pas plus que la méthode de saponification directe, n'a donc été inventée par Kumagawa et Suto, mais ces auteurs, comme pour celle-ci, ont eu le grand mérite d'en établir une technique rigoureuse.

En opérant toujours sur la poudre sèche de chair musculaire, ils ont montré l'insuffisance de l'éther, du chloroforme, de l'éther acétique, de l'alcool méthylique, du benzène, de l'éther de pétrole et de l'acétone. L'alcool seul, s'il est maintenu à une température voisine de son point d'ébullition, permet une extraction complète.

(92) Bogdanow. *Neue Méthode der Fettbestimmung in tierischen Substanzen.* (*Arch. f. d. ges. Physiol. 68*, 431).

(93) O. Frank. *Eine Méthode Fleisch von Fett zu befrein.* (*Zeitschr. f. Biol. 35*, 549).

(94) *Loc. cit.* p. 78.

(95) E. Voit. *Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung.* (*Zeitschr. f. Biol. 35*, 555).

Shimidzu étend ces conclusions aux tissus frais. Dans ce cas, comme Kumagawa et Suto pour la poudre sèche, il n'accorde sa confiance qu'aux deux méthodes proposées par ces derniers.

Shimidzu établit cependant une distinction. Il préfère la saponification directe quand il s'agit des tissus d'organes et la rejette absolument au profit de la méthode alcool quand il s'agit du sang et de ses éléments (sérum, plasma, hématies, etc...) (96).

Comme la plupart des auteurs anciens, comme Shimidzu, suivi du plus grand nombre des auteurs contemporains, nous nous rallions à l'emploi de l'alcool.

Nous n'avons d'ailleurs pas de raisons de ne pas adopter la technique mise au point par Kumagawa et Suto pour les poudres sèches de chair musculaire et reconnue bonne par Shimidzu dans le domaine hématique. C'est ce que nous avons fait en prenant comme terme de comparaison la technique, étendue à la lécithine, de Grimbert et Laudat (97).

Shimidzu, à l'exemple de ses nombreux prédécesseurs, fait intervenir l'alcool en deux temps : un premier temps dans lequel le sang est mis au contact d'un excès d'alcool, d'où résultent un précipité et un soluté. En un second temps le précipité est épuisé à part au moyen de l'alcool. Le résultat de cet épuisement est tantôt réuni au soluté précédent, et alors il n'y a plus qu'à évaporer l'alcool total enrichi de l'eau du sang dont il s'est emparé au cours de la précipitation, tantôt l'alcool d'épuisement sert à laver l'extrait sec issu de l'évaporation de la seconde fraction, tantôt enfin cet extrait sec étant lavé par de l'alcool fort est joint à l'alcool d'épuisement lui-même demeuré fort. Dans tous les cas on obtient un *extrait-alcool total.*

Le premier temps n'a guère éprouvé de modifications depuis l'époque ancienne où il fut inauguré. En revanche, le second a subi des perfectionnements successifs portant sur l'énergie d'extraction et la facilité de sa mise en œuvre. Le plus généralement on emploie l'alcool bouillant. Rappelons à ce propos les travaux des savants suivants : Lecanu

(96) *Loc. cit.* p. 272 4° (p. 113).
(97) Voir p. 96 et suivantes.

(1831) (98), Denis (1838) (99), qui note, soit dit en passant, la quantité supérieure *d'extrait-éther* qu'il obtient en partant du sérum *frais* au lieu de partir du sérum *desséché*. Denis épuisait le précipité protéique avec l'alcool entretenu bouillant en entourant l'entonnoir d'épuisement de charbon de bois embrasé. Il complétait par un lavage à l'éther.

Hoppe Seyler (1872), à son tour, opère d'une manière analogue. Il lave le précipité avec de l'alcool absolu chaud, puis avec un mélange d'alcool et d'éther.

Les chercheurs contemporains : Hepner (1898), Shimidzu, Mayer et Schaeffer, Grimbert et Laudat, etc., adoptent tous l'épuisement à l'alcool du précipité.

Mais les procédés d'épuisement se sont perfectionnés. D'abord par l'emploi de l'appareil Soxhlet on pouvait réduire considérablement la quantité d'alcool mise en œuvre, tout en prolongeant autant qu'on le voulait l'action du solvant.

Par une modification heureuse apportée à l'appareil Soxhlet, Kumagawa et Suto, dans leur étude sur la poudre sèche des tissus, élèvent la température d'extraction au voisinage de la température de l'alcool. Ils complètent ainsi l'extraction tout en réduisant sa durée. Cette modification consiste à élargir le col du ballon du Soxhlet pour y loger le cylindre de verre muni de son siphon, cylindre contenant la matière à épuiser, maintenue ainsi dans la vapeur de l'alcool bouillant. Dans ces conditions, d'après Shimidzu, l'extraction des liposes est *pratiquement* totale.

Si l'extraction est totale, peut-être pourrait-on faire des réserves, — mais purement hypothétiques et qui mériteraient la sanction expérimentale, — sur une altération possible des liposes, parmi lesquelles les phosphatides particulièrement délicates, soumises à une ébullition prolongée d'au moins cinq heures au sein de leur solution alcoolique. C'est là une critique d'ailleurs qui peut se généraliser à l'emploi d'appareils analogues au Soxhlet où les substances dissoutes se concentrent dans leur solvant avec la durée de l'opération, et où périodiquement cette concentration est parfois excessive. Nous avons déjà formulé cette critique et nous avons noté qu'un appareil d'épuisement continu par l'emploi d'une

(98) Voir p. 36-58.
(99) Voir p. 42-59.

quantité très limitée de solvant agissant à une température suffisante et où la substance dissoute échapperait à ces inconvénients, serait donc théoriquement souhaitable. On pourrait concevoir, par exemple, la séparation simultanée de l'extrait, adjointe à l'épuisement.

Quoi qu'il en soit, nous adopterons l'appareil Kumagawa et Suto, d'autant mieux que ces savants ont montré l'identité des nombres obtenus par le moyen de leur appareil nommé, par eux, « Heibextractor », que nous traduisons *extracteur à chaud*, et leur méthode de *saponification directe*. D'après cela, il ne semble pas qu'en ce qui concerne au moins les acides gras à poids moléculaires élevés, sur lesquels ont porté leurs expériences, il soit permis de conserver quelque inquiétude. Même tranquillité d'esprit touchant la cholestérine, substance suffisamment stable.

Shimidzu adopte délibérément cet appareil pour extraire les graisses du sang et nombreux sont ses imitateurs, dont nous serons, quoiqu'il en puisse résulter eu égard aux phosphatides.

§ 3. — Pourquoi et comment, dans notre méthode, l'acétone a été partiellement substitué à l'alcool dans l'extraction des liposes.

Mais revenons au premier temps de la méthode : précipitation du sang dans un excès d'alcool. Ici, nous avons cru devoir à l'alcool substituer l'acétone. Voici à la suite de quelles considérations :

Expériences sur le jaune d'œuf. — Dès 1902, ayant à préparer de fortes quantités de lécithine du jaune d'œuf de poule, nous avons appliqué l'acétone à l'extraction des matières grasses dont les jaunes desséchés contiennent environ 50 p. 100. Un traitement consécutif à l'alcool 95° nous fournissait la majorité de la lécithine.

Expérience I. — Ayant voulu opérer directement sur le jaune d'œuf frais, nous avons constaté une précipitation complète des protéines quand on fait écouler le jaune dans un excès d'acétone. En même temps, celui-ci s'emparait des

graisses en se colorant vivement, les protéines se trouvant, d'autre part, décolorées, surtout si elles étaient ultérieurement épuisées par de nouvelles quantités d'acétone. Mais elles conservaient la plus grande partie de la lécithine dont l'alcool pouvait consécutivement s'emparer.

Nous ne savons si cette propriété précipitante de l'acétone avait été signalée à cette époque, mais nous avons reconnu qu'elle se manifestait à l'égard de tous les liquides albumineux : blanc d'œuf, lait, sang et ses divers constituants. Nous ne pouvions, au reste, en être très surpris. Les solvants des graisses (chloroforme, éther), sont aussi des coagulants des matières protéiques. L'alcool possède cette propriété à un plus haut degré, vraisemblablement à cause de sa miscibilité à l'eau et de son affinité pour elle. Or, comme l'alcool, l'acétone est miscible à l'eau en toutes proportions et si son affinité chimique pour l'eau est contestable, en revanche, c'est un solvant des graisses très supérieur à l'alcool, du moins à température égale.

Nous avons pensé alors que l'acétone pourrait être appliqué avec certains avantages à l'analyse des substances organisées et de leurs dérivés, en utilisant sa double propriété coagulante des protéines et solvante des graisses. De plus, nous pouvions espérer qu'il permettrait la séparation des lécithines de ces dernières.

Ces prévisions sont-elles vérifiées par l'expérience?

L'acétone permet une préparation facile de la lécithine en partant du jaune d'œuf avec un rendement satisfaisant. Cette préparation, bien entendu, n'est pas un dosage. Elle n'en offre pas les garanties numériques auxquelles doit s'astreindre un dosage. En effet, l'acétone ne fournit pas un isolement quantitatif des ovo-lécithines, soit que celles-ci n'y soient pas tout à fait insolubles, soit que leur solution y soit favorisée par la présence d'autres matières solubles, comme les liposes. Il n'en reste pas moins vrai qu'on retrouve dans l'acétone une certaine proportion, — faible toutefois, — des ovo-lécithines.

Pour donner une idée des proportions des substances ainsi séparées par l'intervention successive de l'acétone et de l'alcool sur un jaune d'œuf frais, citons les nombres ci-après que nous avons déterminés :

	Poids trouvés	Pour 100		
Jaune d'œuf	20.140	100.00		
Extrait acétone-éther	4.6680	23.17		
Extrait alcool-éther	1.7207	8.54	25.97	49.14
Insoluble acétone-alcool-éther . . .	3.5110	17.43		

L'*extrait acétone-éther* est obtenu de la manière suivante : le jaune d'œuf est écoulé en mince filet dans un grand excès d'acétone contenu dans un verre conique. On agite vivement, on laisse reposer et on filtre sur papier par décantation. On lave le précipité à l'acétone à froid jusqu'à ce que celui-ci ne se colore plus. Toutes les liqueurs acétoniques réunies, occupant un volume de 250 centimètres cubes environ, sont évaporées et le résidu séché dans le vide à une température voisine de 50°. Quand le vase taré ne varie plus de poids, on reprend par l'éther absolu, lequel abandonne un nouveau résidu. La solution éthérique, filtrée sur amiante, fournit une solution jaune d'or, évaporée à son tour. Le résultat de l'évaporation, séché comme précédemment, donne *l'extrait acétone-éther* dans lequel on distingue une partie liquide huileuse et une partie solide. Ce résidu est soluble complètement dans un peu d'éther absolu.

L'insoluble acétone presque décoloré par l'opération précédente, est soumis à froid à un nouveau lavage à l'alcool 95° jusqu'à ce que les alcools passent complètement incolores et n'abandonnent pas de résidu à l'évaporation. Un lavage consécutif à l'éther absolu n'enlève presque plus rien et laisse un *insoluble acétone-alcool-éther* presque blanc. L'alcool évaporé donne un extrait séché dans le vide à 50°; repris par l'éther absolu, il y est totalement soluble.

Les solutions éthériques réunies donnent après évaporation et lavage l'extrait *alcool-éther*.

Remarquons en passant que la somme des deux extraits et de l'insoluble est égale à 49,14, c'est-à-dire sensiblement la moitié du poids du jaune d'œuf frais. Or, la moyenne de très nombreuses expériences est d'environ 50 p. 100 pour la teneur en eau du jaune d'œuf, 50 p. 100 restant pour les autres matériaux. La somme précédente respecte ici cette moyenne et nous voyons par là qu'elle doit représenter, à peu de chose près, l'ensemble des constituants du jaune.

L'extrait acétone-éther représentant *l'huile d'œuf* 23,17

vaut aussi à peu près la moitié du jaune sec, ou du moins le nombre représentant approximativement ce jaune sec, soit 49,14. Ce qui répond également à la moyenne résultant d'analyses faites par les procédés ordinaires. De même le poids *d'extrait alcool-éther* répond au poids de lécithine qu'on dose habituellement dans les jaunes d'œufs de poule. De tout cela il serait cependant téméraire de conclure à l'isolement quantitatif à l'état de pureté de la lécithine d'une part, des *lipoïnes*, de l'autre.

Si nous admettons que parmi les composés phosphorés du jaune d'œuf, seules les lécithines s'engagent en solution dans l'éther absolu, il suffit de constater la présence du phosphore dans *l'extrait acétone-éther* pour conclure à l'insuffisance de l'acétone comme isolateur de la lécithine.

L'extrait acétone-éther provenant d'une autre épreuve, incinéré en présence du flux blanc, le phosphomolybdate d'ammonium y révèle bien alors la présence du phosphore. D'autre part, nous nous garderons de considérer l'extrait alcool-éther comme lécithine pure.

Nous n'avons pas pour but de rechercher ici, au surplus, un mode de préparation des lécithines de l'œuf : nous voulons simplement montrer l'incapacité de l'acétone à séparer les lécithines des autres liposes. L'expérience précédente est déjà probatoire. Si elle avait été négative, elle n'aurait rien prouvé. En effet, les lécithines de l'œuf peuvent s'y trouver sous une forme telle que l'acétone soit impuissant à s'en emparer. Un résultat négatif nous aurait donc laissé dans l'incertitude.

Expérience 2. — Exécutons maintenant la contre-expérience suivante : ayant épuisé des jaunes d'œuf (secs cette fois) par un excès d'acétone à froid, on dessèche l'huile ainsi obtenue dans le vide vers 50°. Son poids est de 1,7555. On y dose le phosphore par incinération au moyen d'un flux blanc. On en obtient 0,0039 en P^2O^5 dosé volumétriquement, ou en lécithine :

$$0{,}0039 \times \frac{(\text{Lécithine} = 11{,}56)}{1/2\ P^2O^5} = 0{,}0450$$

ou

$$\left(\frac{0{,}0450}{1{,}7555} = 0{,}0256\right) \times 100 = 2{,}56 \text{ p. } 100.$$

Considérons maintenant une certaine quantité de la même huile et ajoutons-lui, en le dissolvant, un poids déterminé de lécithine, par exemple 0,2276 pour 2,1629 d'huile, soit 10,52 p. 100.

Cette solution, très limpide, est traitée par 5 ou 6 fois son volume d'acétone pur du bisulfite. Il se forme un abondant précipité. Le tout est entouré de glace et le mélange bien refroidi est filtré sur papier lavé et mouillé d'acétone. On lave à l'acétone le restant du précipité adhérent au vase en le malaxant avec un agitateur et en le roulant contre les parois de façon à multiplier les surfaces. Trois renouvellements d'acétone suffisent pour obtenir une liqueur de lavage bien incolore et exempte de résidu. Toutes ces fractions acétoniques sont filtrées dans un petit ballon où elles ne déterminent au sein du premier filtrat aucun louche, par quoi on peut admettre que l'excès d'acétone, employé au début, a été suffisant pour séparer toute la lécithine précipitable.

Celle-ci est reprise en totalité par l'éther absolu, séchée dans le vide sec pendant 3 heures et pesée. On a ainsi un poids de 0,1445 qui devient 0,1420, quinze jours après de conservation dans ce même vide sec.

De la lécithine dissoute au début par l'huile, il ne reste donc plus, après précipitation, que $0,2276 - 0,1420 = 0,0856$ ou 3,95 p. 100 sur 10,52. $10,52 - 3,95 = 6,57$ p. 100 ont été éliminés par l'acétone, soit $\left(\frac{6,57}{10,25} \times 100 = 0,624\right) \times 100 =$ 62,45 p. 100 ; près des 2/3 du total de la lécithine ajoutée.

Cette lécithine précipitée est d'ailleurs pure. Incinérée au flux blanc, elle donne, en effet :

$P^2O^7Mg^2 = 0,0196$, d'où lécithine $= 0,0196 \times 7,21 = 0,1413$.

Comme contrôle, recherchons le poids de l'huile restante dissoute dans l'acétone. On évapore ce solvant dans le vide vers 50° et on pèse quand toute bulle gazeuse a disparu. On trouve dans le ballon taré où l'on a opéré un poids de 2,248 d'huile. L'augmentation de poids entre cette dernière et l'huile primitive est de $2,248 - 2,1629 = 0,0851$, augmentation justement égale à la différence 0,0856 entre la lécithine ajoutée et la lécithine précipitée.

L'expérience précédente est suffisante pour montrer l'impuissance de l'acétone à précipiter la totalité de la lécithine

dissoute dans l'huile d'œuf, quel que soit d'ailleurs l'excès d'acétone employé. Il existe peut-être un certain rapport limite d'équilibre entre les proportions relatives d'huile et de lécithine, rapport non détruit, à partir de cette limite, par la dilution de la première dans l'acétone. Nous n'étudierons pas ici cette question de rapport, trop éloignée de notre sujet. Constatons simplement qu'il paraît augmenter, quand à l'huile solvante de la lécithine, on ajoute un deuxième solvant de l'une et de l'autre. Une solution d'huile lécithinée, ayant même teneur que la précédente, 10 p. 100, étendue *d'une petite quantité* de chloroforme, ne fournit, sous l'influence d'un excès d'acétone, qu'une quantité très inférieure de lécithine à celle trouvée précédemment en l'absence de chloroforme.

Ces faits montrent donc l'influence des solvants de la lécithine sur son insolubilité relative dans l'acétone. Cette insolubilité paraît augmenter quand décroissent la force du solvant et son volume. Il y aurait lieu d'étudier ce que deviendrait la solubilité de la lécithine dans l'acétone, si le solvant intermédiaire disparaissait.

Nous avons noté précédemment la présence du phosphore dans l'huile extraite par l'acétone à froid. Nous l'avons traduit en lécithine sans être certain de la nature organique ou minérale de ce phosphore, penchant plutôt vers l'hypothèse lécithine en raison de la complète solubilité de cette huile dans l'éther absolu. On pourrait s'étonner de cette faible proportion de lécithine 2,56 p. 100 entraînée par l'huile acétonée quand on vient de constater qu'un excès d'acétone laisse encore en dissolution au moins 3,95 p. 100 de lécithine véritable et peut-être $3,95 + 2,56 = 6,51$ p. 100 de lécithine probable. On peut expliquer ce phénomène soit par les conditions mêmes d'extraction de l'huile entraînant la lécithine en dissolution d'une manière différente quand elle se trouve immédiatement en présence d'un excès d'acétone, soit par suite d'une forme particulière de combinaison de la lécithine non dissoute, combinaison non détruite par l'acétone.

Il faudrait aussi, après cela, examiner le rôle de la température, la nature du solvant, etc.. Nous présenterons ultérieurement les résultats de nos travaux sur ces divers points, à propos d'une méthode d'analyse des tissus organisés et de leurs

dérivés, méthode calquée sur celle que nous décrivons ici à propos du sang. Si nous nous sommes permis d'en extraire et d'en présenter les résultats précédents, c'est pour montrer l'insuffisance quantitative de l'acétone vis-à-vis de la lécithine, insuffisance sur laquelle nous ne nous sommes jamais fait d'illusion et qui se trouve ainsi généralisée puisqu'elle est une confirmation des résultats obtenus par Kumagawa et Suto à propos des tissus musculaires secs (100). Nous la tiendrons aussi pour vraie en ce qui concerne le sang, où nous avons été d'abord naturellement tenté d'appliquer l'acétone en vue de séparer la lécithine des autres liposes.

Avant d'y revenir, examinons encore quelques points nouveaux. Tous les auteurs s'accordent à reconnaître l'existence de la cholestérine dans le jaune d'œuf. Cette substance s'incorpore facilement aux liposes, de plus, elle est soluble dans l'acétone. Il est donc vraisemblable qu'on devra la retrouver avec beaucoup plus de raison encore que la lécithine dans l'huile extraite par l'acétone. Y sera-t-elle entraînée en totalité? On ne saurait l'affirmer sans épreuve expérimentale car, tout comme la lécithine, une certaine partie de la cholestérine peut exister dans le jaune sous forme d'une combinaison particulière, protéique ou autre, inaccessible aux effets de l'acétone. On peut concevoir, par exemple, dans l'agrégat vivant du jaune d'œuf, une portion de cholestérine et de lécithine plus spécialement incorporée à la masse des matières grasses, les autres portions rattachées, au contraire, aux matières protéiques. Les premières suivraient seules les matières grasses entraînées par leurs solvants habituels. Au contraire, l'alcool succédant à l'acétone s'emparerait de la lécithalbumine et de la cholestérinalbumine, en dissociant ces composés suivant les conceptions de Grigaut pour la cholestérine du sérum sanguin.

Quoi qu'il en soit, l'huile précédemment traitée par l'excès d'acétone, privée de la lécithine précipitée et de toute trace d'acétone, saponifiée par une solution alcoolique de soude et épuisement consécutif du résidu (desséché à l'étuve 100°) par l'éther de pétrole, donne, après évaporation de ce dernier, un produit cristallisé blanc du poids de 0,0406 (soit 1,86 p. 100

(100) *Loc. cit.* p. 79.

sur l'huile primitive) offrant les caractéristiques de la cholestérine.

Bien que ce nombre réponde à peu près aux proportions de cholestérine donnée par Gobley et Parker, nous nous abstiendrons de le considérer comme exact, n'ayant point démontré rigoureux son mode d'extraction par l'acétone et son isolement consécutif. Mais il ne s'agit pas ici, nous le répétons, de discuter sur l'analyse elle-même de l'œuf, mais simplement de nous faire une idée de l'action de l'acétone.

Examinons maintenant cette action sur les protéïnes.

L'huile débarrassée complètement d'acétone par évaporation dans le vide vers 50° est complètement soluble, sans résidu, par l'éther absolu, le chloroforme, le benzène, etc. Nous n'avons pas recherché si elle contient de l'azote, mais si cet élément s'y rencontrait, il semble peu probable qu'en raison des solubilités intégrales précédentes, il provînt de substances protéiques, au moins de substances protéiques non altérées.

Il en est de même en ce qui concerne l'*extrait-alcool*, surtout riche en lécithine, comme nous l'avons vu. Cet extrait est de même complètement soluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène, et est donc probablement exempt de protéïnes, s'il ne l'est pas de certains autres composés azotés, non comprise la lécithine. Par conséquent, tous les albuminoïdes seraient réunis dans le résidu respecté par l'action successive à froid de l'acétone et de l'alcool.

Nous ne parlerons pas des expériences exécutées dans ce sens, mais la suivante montre la précipitation complète des albumines du blanc d'œuf :

Expérience sur le blanc d'œuf. — On a dissous dans 10 centimètres cubes d'eau froide environ 25 centigrammes d'albumine d'œuf desséchée et on a filtré.

4 centimètres cubes ont été traités, après avoir été étendus d'eau, par NaCl et 1 goutte $CH^3.COOH$ et portés au bain-marie bouillant pendant 10 minutes environ. Le précipité blanc est abondant et se dépose lentement. Il est filtré par décantation et lavé à l'eau bouillante, puis à l'alcool et à l'éther, séché à l'étuve à 100° et pesé à constance de poids. On trouve 0 gr. 0197.

4 centimètres cubes de la même solution sont écoulés dans environ 30 centimètres cubes d'acétone neutre et sans résidu à l'évaporation. Une seule goutte d'ailleurs de la solution albumineuse fournit déjà un nuage dans l'acétone. On agite; le précipité, floconneux et blanc, se dépose très rapidement. On filtre de suite et on lave avec un peu d'acétone pour faire écouler les petites quantités restées dans le verre, ce qui ne présente pas de difficultés. Le filtrat est distillé dans un ballon afin de voir s'il restera un résidu solide de nature albuminoïde. Ce résidu a pour poids 0,0079. Très brun, il ne paraît pas entièrement soluble dans l'éther, auquel il cède une coloration jaune. Il conserve néanmoins une couleur brunâtre et avait primitivement une odeur de caramel. Au reste, il est très facilement soluble en brun dans l'eau froide, au moins en très grande partie, car il y a une faible partie insoluble. On la délaie avec un agitateur dans un peu d'eau. Une portion de cette eau, trouble, versée dans un tube, est soumise à la réaction du Biuret, mais cette réaction est absolument négative et la liqueur trouble ne fait que s'éclaircir en restant à peine verte.

La réaction de Liebermann est également négative et donne simplement lieu à éclaircissement de la liqueur, comme la première.

On peut donc conclure à l'absence des matières albuminoïdes entraînées par l'acétone.

Le filtratum, un peu jaunâtre, d'aspect cireux, est lavé à l'eau bouillante dans le but d'enlever les matières salines, ce qui provoque une légère ébullition (vapeurs d'acétone) mais sans perte. L'alcool et l'éther succèdent à l'eau bouillante et après dessiccation le poids du coagulum devient 0,0126.

L'eau de lavage est d'abord un peu jaunâtre, quoique limpide. La suivante est un peu écumeuse, ce qui donnerait à penser qu'elle emporte de l'albumine. Pour s'en assurer, ces deux eaux sont réunies et évaporées à sec. Elles donnent un résidu d'un poids égal à 0,0135.

Ce résidu, qui a tout à fait l'aspect d'albumine coagulée, donne, en effet, la réaction du Biuret (un peu de substance imprégnée de SO^4Cu puis d'un excès de NaOH est colorée en violet rouge) et la réaction de Liebermann (un peu de subs-

tance chauffée avec HCl et quelques gouttes SO^4H^2 devient violette). De plus, la dite substance est insoluble dans l'éther. L'eau bouillante a donc pu redissoudre une partie des matériaux précipités par l'acétone, ce qu'elle est incapable de faire quand la précipitation provient de l'action de la chaleur sur un milieu acide.

Le résidu précédent, joint au coagulum respecté par l'eau, donne un total de $0,0126 + 0,0135 = 0,0261$, coagulum total précipité par l'acétone.

Une seconde double expérience fournit les nombres suivants :

1° Pour le coagulum de chaleur avec acidification de la solution albuminoïde : 0,0208.

2° Pour le coagulum d'acétone sans lavage à l'eau : 0,0256.

Moyennes respectives :

$$\text{Pour le premier } \frac{0,0197 + 0,0208}{2} = 0,02025$$

$$\text{Pour le second } \frac{0,0261 + 0,0256}{2} = 0,02585$$

La chaleur a donc précipité seulement les 78,37 p. 100 du précipité de l'acétone, lequel est donc supérieur de 21,63 p. 100.

Cela peut tenir à plusieurs causes : 1° l'acétone a précipité un surplus de protéines que la chaleur ne précipite pas; 2° l'acétone a précipité des corps étrangers insolubles (sels).

Ces expériences prouvent au moins l'égalité des deux procédés à l'égard des protéines du blanc d'œuf et peut-être la supériorité de l'acétone, puisqu'elles établissent la précipitation complète de ses protéines par l'acétone.

Action précipitante de l'acétone sur les peptones. — Une peptone en poudre (marque Poulenc) dissoute dans l'eau, est précipitée par l'acétone avec facilité, même sous une assez grande dilution. La précipitation paraît s'effectuer mieux qu'avec l'alcool. La peptone, essayée, ne précipite ni par la chaleur, ni par la chaleur acétique, ni par le ferro-cyanure neutre ou acétique, ce qui exclut la présence des albumines et des albumoses. En revanche, elle précipite par le lugol et le tanin acétique.

Cependant, la solution ferro-cyanure-peptone observée quelque temps, d'abord très limpide, finit par louchir au bout de 10 minutes environ. De plus, le réactif de Tanret donne un abondant précipité soluble à chaud, se reformant à froid.

Cette peptone répond, en somme, à la définition des peptones et dans tous les cas elle ne contient pas d'albumine proprement dite, car NaCl acétique à chaud laisse la liqueur limpide.

Action précipitante de l'acétone sur du lait écrémé soumis à la digestion sous l'influence d'un microbe protéolytique actif. — Ce lait, filtré, est d'un jaune clair. La chaleur + acide acétique ne donne rien. Le ferrocyanure acétique détermine un léger louche, au moins avec le temps. La liqueur de Tanret donne un précipité abondant, soluble par la chaleur, se reformant avec le froid. L'alcool et l'acétone comparés, ce dernier, à volume égal, donne un précipité beaucoup plus abondant.

Action précipitante de l'acétone sur le lait naturel. — De même avec le lait naturel non écrémé. Le précipité acétonique est immédiat, mais reste en suspension quelque temps. L'acétone filtré et évaporé laisse une matière grasse abondante (beurre).

Le précipité acétonique, repris par l'alcool, donne à son tour, mais en très petite quantité, un résidu gras (lécithine?).

Avantages et inconvénients comparés de l'emploi de l'alcool et de l'acétone dans leur action à froid sur les milieux albumineux. — Ces expériences de début constituent, à vrai dire, un encouragement à examiner l'action de l'acétone sur d'autres milieux riches en matières protéiques. En ce qui concerne le jaune d'œuf, sa supériorité sur l'alcool ne paraît absolument pas douteuse : séparation intégrale des protéines à l'instar de l'alcool, mais pouvoir dissolvant des graisses très supérieur, les dites graisses étant médiocrement miscibles à l'alcool, surtout à froid, où leur précipitation est presque complète: enfin isolement très satisfaisant des lécithines, entraînées par l'alcool après l'action de l'acétone, d'avec les autres liposes.

D'une manière générale, cependant, observons-le, les pré-

cipités protéiques comparés de l'alcool et de l'acétone dans la plupart des milieux liquides paraissent moins abondants quand ils proviennent du second.

Mais les avantages et les inconvénients de l'un et de l'autre solvant, mis en balance, nous ont engagé à accorder la préférence à l'acétone dans les cas où l'on fait habituellement agir l'alcool à froid aux fins d'analyse sur les tissus et les matières en dérivant. Voici, résumé, le tableau comparatif de l'action générale de ces deux liquides, employés dans les mêmes cas où il s'agit d'exercer leur action sur le tissu à froid :

	ALCOOL	ACÉTONE
Pouvoir précipitant sur les protéines.	Très élevé, presque total.	Un peu moins élevé.
Précip. obtenu.	Assez long à se déposer, grains grossiers.	Très fin, rapidement déposé.
Pouvoir solvant des graisses.	Faible.	Très élevé.
Miscibilité à l'eau.	En toutes proportions.	En toutes proportions.
Évaporation à froid à l'air libre. . .	Assez lente.	Rapide.
Point d'ébullition.	78°,4	56°,3
Distillation à diverses pressions. .	Assez lente.	Rapide.
Densité.	0,801	0,792

Pratiquement, au point de vue particulier qui nous occupe ici, c'est-à-dire le dosage des liposes, on doit retenir en dehors de l'activité dissolvante de l'acétone, les facilités de manipulation que suppose son emploi et leur rapidité d'exécution, déjà vérifiées dans les expériences précédemment décrites : décantation des liqueurs, évaporation des filtrats, régénération du solvant, etc. Ces avantages prennent surtout de l'importance quand on est assujetti à un grand nombre d'opérations simultanées ou successives.

§ 4. — Sur les proportions relatives du mélange sang-acétone.

Evaluation de la prise d'essai minima de sang. — Parmi les éléments liposiques sur lesquels s'exerce notre méthode

en vue de leur dosage, la cholestérine n'est pas le moins important, comme nous l'avons déjà noté plusieurs fois. Nous allons la prendre comme exemple pour évaluer la prise d'essai minima de sang à analyser.

La quantité des matières grasses dans le sang avoisine un taux normal moyen d'environ 0,5 p. 100, sur lequel reviennent à peu près 0,1 à 0,2 p. 100 à la cholestérine. Or, par notre méthode, nous pesons directement cette substance après l'avoir isolée. Cette appréciation pondérale, pour comporter de l'exactitude relative, doit se maintenir entre certaines limites dépendant de la sensibilité de l'instrument de pesée employé. On se sert habituellement d'une balance donnant le 1/10e ou le 1/20e de milligramme, ce qui est le fait de celle avec laquelle nous avons toujours opéré. Soit p le poids réel de la substance pesée. Supposons qu'une erreur, prise à dessein très forte, mais d'ailleurs possible en plus ou en moins, de 0,0005 soit commise sur ce poids réel, le gramme étant pris pour unité. Le poids retenu apparent sera donc : $p \pm 0{,}0005$. Que deviendra ce poids quand on le rapportera à 100? Soit 0,1 le poids réel rapporté à 100. On aura :

$$\frac{p}{x} = \frac{0{,}1}{100} = \frac{1}{1000}$$

x étant le poids de substance primitive, c'est-à-dire de sang pesé, d'où l'on a déduit le poids p de cholestérine.

On a encore :

$$\frac{p \pm 0{,}0005}{x} = \frac{1 \pm \varepsilon}{1000}$$

Divisons membre à membre :

$$1 \pm \varepsilon = \frac{p \pm 0{,}0005}{p}$$

d'où

$$\pm \varepsilon = \frac{p \pm 0{,}0005}{p} \pm 1$$

$$\varepsilon = \frac{0{,}0005}{p}$$

ε est donc inversement proportionnel à p. On a donc tout

intérêt à augmenter p. Pour cela, il faut augmenter x. Mais ces deux nombres qui dépendent étroitement l'un de l'autre sont aussi en étroite relation avec les conditions expérimentales. x est subordonné au volume de sang qu'il est possible de prélever et varie donc suivant l'animal et, chez l'homme, suivant le malade.

La valeur de x dépend encore des moyens opératoires, de la méthode, de sa précision, etc. Enfin de tout un ensemble de conditions optima qu'il faut accorder et harmoniser.

Or $p = \frac{x}{1000}$ d'où

$$\varepsilon = \frac{0{,}0005}{x} \times 1000$$

Si, par exemple, la valeur de x est égale à 10,

$$\varepsilon = \frac{0{,}0005}{10} \times 1000$$

$$\varepsilon = 0{,}0005 \times 100 = 0{,}05$$

Par conséquent l'erreur serait les $\frac{5}{100}$ de la valeur réelle du poids de la cholestérine rapportée à 100. De $x = 10$ on déduit $p = 0{,}01$. En prenant 10 grammes de sang, on aura donc 0,1 de cholestérine rapportée à 100 grammes de sang avec une incertitude des $\frac{5}{100}$ de sa valeur,

soit : $$\frac{0{,}1 \times 5}{100} = \frac{0{,}5}{100} = 0{,}005$$

La valeur réelle de p serait donc comprise entre 0,105 et 0,095, soit une incertitude maxima de 1 p. 100. On est placé, en somme, dans des conditions favorables quand l'erreur n'intéresse que le second rang après le chiffre nominal obtenu. En prenant de 10 à 20 centimètres cubes de sang on se trouve dans des conditions satisfaisantes de pesée de la cholestérine finale, en tombant sur des centigrammes évalués avec une balance au 1/10^{e} ou au 1/20^{e}. Comme la cholestérine est celle des liposes, dont la quantité figure

généralement comme la plus faible, c'est à ce poids ou ce volume de 10 grammes à 20 grammes, de 10 centimètres cubes à 20 centimètres cubes de sang ou d'un de ses composants liquides que nous fixerons notre prise d'essai chez l'homme.

Volume d'acétone correspondant. — Quel est maintenant le volume d'acétone à choisir pour y diluer cette quantité de sang? Quel est d'abord le degré de pureté auquel nous devons astreindre cet acétone?

Il importe naturellement qu'il soit exempt de toute matière fixe. Sa neutralité devra aussi être vérifiée. Enfin si son point d'ébullition est fixé à 56-57°, on aura un ensemble suffisant de garanties de sa pureté.

Evidemment l'acétone du bisulfite remplirait ces conditions. En général, on peut se contenter de distiller sur un peu de chaux vive et de chlorure de calcium fondu l'acétone ordinaire, ce qui le neutralise, le rend anhydre et le prive de matières fixes.

Le sang doit se trouver en présence d'un grand excès d'acétone. C'est le volume minimum nécessaire qui doit nous occuper, volume minimum capable de précipiter le maximum de matières protéiques et de solubiliser le maximum de matières grasses.

Nous n'avons pas fait dans ce but d'expériences systématiques, n'attachant pas une très grande importance à cette question. Nous nous sommes contenté d'une évaluation visuelle, ce qui nous a conduit à adopter un volume d'acétone égal à celui qu'on met habituellement en jeu avec l'alcool. Les auteurs contemporains, après beaucoup de ceux de tout le XIX^e^ siècle, mélangent généralement le sang à 10 fois son volume d'alcool. Par conséquent, nous nous en tiendrons à cette proportion.

Il n'y a d'ailleurs guère d'intérêt à la dépasser, si nous voulons sur l'alcool obtenir un des premiers avantages de rapidité d'évaporation.

Il est naturel de favoriser l'excès d'acétone dès le premier contact. C'est pourquoi nous versons le sang dans l'acétone sans faire l'inverse. Cette manière est d'ailleurs la seule qu'il serait possible d'adopter si l'on voulait recevoir immédiatement le sang dans l'acétone au sortir du vaisseau.

Le sang ou l'un de ses composants liquides est donc versé lentement, en mince filet, dans 10 fois son volume d'acétone, soit 100 centimètres cubes s'il s'agit de 10 centimètres cubes de sang. On assiste alors aussitôt à la formation d'un précipité abondant, blanc, fin. On agite vivement au moyen d'un agitateur. Le précipité ne tarde pas à s'amonceler au fond du verre en laissant surnager une liqueur d'un jaune plus ou moins vif en relation avec le degré de pigmentation du sérum.

La même expérience répétée avec l'alcool 95°, dans les mêmes proportions, donne des résultats semblables. Toutefois, il y a lieu de noter les faits suivants : Avec l'alcool, le précipité est moins fin et se réunit beaucoup plus lentement au fond du verre. Un quart d'heure suffit pour compléter le conglomérat au sein de l'acétone. Plus d'une heure est nécessaire avec l'alcool. Ce serait là un avantage évident offert par l'acétone si l'on se proposait de laver le coagulum pour l'épuiser à froid, opération à laquelle nous nous étions assujetti au début de notre travail, aux fins de faciliter l'épuisement consécutif à l'alcool bouillant. Cet épuisement, s'il est exécuté par l'*extracteur à chaud* de Kumagawa et Suto, dispense d'un épuisement préalable complet à l'acétone, comme nous le verrons. On peut immédiatement, en effet, filtrer la liqueur jaune surnageante sur la cartouche filtrante de cet appareil. On peut même, ce qui est encore plus simple et fait gagner du temps, agiter à nouveau vivement le mélange dans le verre où il est contenu et le verser dans la cartouche. On entraîne ainsi d'un coup tout le précipité. On verse ensuite quelques centimètres cubes d'alcool 95° sur le précipité, après avoir rincé avec cet alcool le verre et l'agitateur. De cette manière, on est dispensé de sécher la cartouche (d'ailleurs chose facile à l'étuve 40 ou 50°, mais avec crainte d'oxydation possible de certaines liposes). L'acétone est entraîné par l'alcool : la cartouche est prête pour l'épuisement final par ce liquide.

Dans ces premières manipulations, déjà, plusieurs avantages peuvent être notés à l'actif de l'acétone.

En admettant qu'il fut possible de filtrer le mélange alcool comme le mélange acétone quelques minutes après son contact avec le sang, la filtration est déjà beaucoup plus lente

avec l'alcool et n'épargne d'ailleurs pas le lavage du verre avec une petite quantité de ce liquide. Mais il y a autre chose. Shimidzu (101), Grimbert et Laudat (102), conseillent une macération préalable dans l'alcool, de 12 heures. C'est là un retard de 12 heures sur l'acétone. Si l'inutilité de cette macération était démontrée, la rapidité d'exécution n'en demeurerait pas moins encore à l'actif de l'acétone.

§ 5. — **Hypothèses sur le mécanisme comparé de l'action de l'alcool et de l'acétone sur les milieux albumineux.**

Quel est le mécanisme d'action de l'alcool?

Ce corps est miscible à l'eau en toutes proportions. Il exerce même sur elle une énergie d'attraction assez considérable quand il est lui-même voisin de la déshydratation absolue. Il semble précipiter les protéines en s'emparant de leur eau d'imprégnation, si ce n'est pas de leur eau de constitution. En effet, d'un côté, quand l'alcool baisse en degré, son pouvoir précipitant diminue et s'exerce seulement sur les protéines les plus complexes, les autres demeurant solubles (peptones, par exemple). D'autre part, les protéines précipitées par l'alcool sont en majeure partie redissoutes quand elles sont reprises à l'eau froide. Elles ont conservé leurs propriétés dans cette nouvelle solution aqueuse et ne semblent donc pas avoir été sensiblement altérées par l'alcool.

L'alcool dissout des matières grasses, des corps azotés, des pigments. Visiblement le temps ne paraît pas accroître beaucoup son action : l'abondance du coagulum demeure invariable. Au contraire, la coloration, constante quant à son intensité pendant deux ou trois jours, s'atténue par la suite et présente une tendance à s'évanouir. En même temps peuvent apparaître des dépôts cristallins, surtout si le vase n'est pas bien bouché : urée? éthers de la cholestérine?

Il y a donc lieu d'envisager un maximum de durée dans la macération et on peut se demander sur quelles raisons le

(101) *Loc. cit.* p. 113.
(102) Voir p. 96.

minimum (du reste évidemment approximatif) de 12 heures est recommandé. On espère ainsi sans doute préparer la substance à une extraction à l'alcool chaud plus complète et plus facile. Nous n'apercevons pas les raisons sur lesquelles reposent cette espérance. Des expériences comparatives seules élucideraient la question, si elles n'ont été déjà faites. Elles ne nous apparaissent pas d'ailleurs bien utiles, car s'il se peut que l'alcool disloque les combinaisons protéiques, comme le disent Grimbert et Laudat, cette dislocation serait immédiate.

Quoi qu'il en soit, l'action de l'alcool nous apparaissant comme principalement déshydratante, nous le considérons comme n'ayant d'autre but essentiel que de priver d'eau les tissus, de manière à les mettre en état de subir l'intervention d'une nouvelle quantité d'alcool fort, la force de celui-ci étant respectée puisqu'elle ne peut plus être atténuée par l'humidité, dont on a privé préalablement la substance.

L'alcool, il est vrai, comme on l'a vu, aurait encore une force de pénétration et de dissociation dont l'effet serait de détruire certaines combinaisons protéiques. Ainsi, par exemple, Grigaut explique-t-il qu'il soit possible d'extraire la cholestérine totale dont une partie serait à l'état de protéocholestérides. Mais cette destruction serait immédiate, d'après le procédé colorimétrique de Grigaut, et même au moyen d'un alcool à 50° seulement.

L'action de l'acétone paraît encore plus complexe sur les protéines, mais le résultat final qui nous préoccupe demeure le même. Son pouvoir dissolvant sur les liposes, très supérieur à celui de l'alcool, est plus considérable aussi envers les pigments : sa coloration plus intense en témoigne. Et comme ces pigments sont principalement des lipochromes, c'est un nouveau témoignage sensoriel direct, s'il n'est que probable, de la quantité supéricure des liposes dissoutes.

Il possède un point commun important avec l'alcool : sa miscibilité à l'eau en toutes proportions. Comme l'alcool, c'est un déshydratant : il prive d'eau le précipité formé en son sein. L'alcool fort, chaud, interviendra alors utilement à son tour.

Mais pourquoi cet alcool? Pourquoi ne pas continuer l'épuisement à chaud, cette fois, avec de l'acétone anhydre?

L'expérience répond : parce qu'il est incapable d'entraîner la totalité des liposes.

L'hypothèse explique : parce que son point d'ébullition n'est pas suffisant. La température au maximum 56° est trop basse. Celle de l'alcool étant plus élevée, son action est plus complète.

Pour vérifier cette prévision, il suffirait donc d'élever la température, d'opérer, par exemple, sous pression, ou peut-être à la pression ordinaire de faire agir les vapeurs vers 70° à l'instar de l'alcool, puis de les condenser ensuite, naturellement, sur la matière à épuiser. Les appareils capables de réaliser ces conceptions ne sont probablement pas inimaginables et nous pensons plus tard nous occuper de cette question. Nous nous contenterons, pour le moment, de nous en tenir à l'alcool, dont la quantité à intervenir à présent étant assez faible (30 ou 40 centimètres cubes) son infériorité vis-à-vis de l'acétone disparaît en partie.

Nous entrerons dans une étude comparative plus détaillée de l'action de l'alcool et de l'acétone à propos de la description complète de chacune de nos expériences.

§ 6. — Etat et conservation du sang soumis à nos expériences.

Nous avons montré quel enchaînement d'idées nous a conduit à introduire l'acétone dans le dosage des liposes du sang. Nous allons poursuivre l'exposé de ce travail en nous inspirant du même système logique de description. Ainsi nous arriverons peu à peu à serrer la question de plus près pour en dégager enfin une technique réduite capable d'applications pratiques, tout en conservant un caractère de précision scientifique.

Nous aurions pu adopter un plan d'exposition analogue à celui de Kumagawa et Suto dans leur travail ; nous ne l'avons pas fait pour les raisons suivantes :

Ces auteurs ont fait porter leurs investigations sur un produit qu'ils considéraient comme constant dans sa composition, malgré le temps considérable nécessaire à l'adoption de conclusions définitives. Il s'agissait dans leur cas, comme on

sait, de chair musculaire desséchée et réduite en poudre, conservée en présence de chlorure de calcium dans des récipients clos. Ainsi, comptant sur la conservation complète de cet objet d'études, prélevaient-ils suivant leurs besoins, les prises d'essai nécessaires à leurs expériences.

Quand il s'agit du sang frais, quelques difficultés surgissent. Peut-on être assuré de sa parfaite conservation avec le temps et en dépit de l'emploi des précautions les plus recommandées? Quand on a l'ambition de déterminer la nature des éléments constitutifs du sang circulant, il faut évidemment étudier ce milieu dans les conditions où il est possible de le comparer avec quelque certitude à son état primitif de vitalité. La première condition à remplir est donc d'opérer sur le sang dès son émission. L'animal étant soumis à un régime déterminé, l'aiguille de ponction sera introduite dans le vaisseau choisi, et le sang directement reçu dans un appareil contenant au besoin et à l'avance, l'acétone, appareil conçu de manière à éviter les pertes et à permettre la pesée de la prise d'essai.

S'il s'agissait d'étudier le sérum, le sang, recueilli aseptiquement dans un vase stérilisé, serait placé dans une glacière jusqu'à coagulation suffisante.

Dans l'établissement d'une méthode, cet ensemble de précautions minutieuses n'est pas indispensable. Il faut surtout obtenir des résultats comparables et, d'autre part, si l'on veut établir cette méthode pour l'appliquer ordinairement à l'analyse du sang frais, il est préférable de se rapprocher le plus possible des conditions grâce auxquelles le sang, sur lequel on expérimente, restera dans une constance de composition, offrant des garanties suffisantes pour adapter les résultats recueillis, au sang frais lui-même, avec un degré de certitude suffisant.

Sans doute nous aurions pu dessécher le sang ou le sérum, comme l'ont fait Kumagawa et Suto pour la chair musculaire, et admettre, comme eux, une parfaite inaltérabilité du produit ainsi obtenu, mais nous n'aurions pu alors considérer nos conclusions comme adaptables au sang frais, tout en tenant compte, bien entendu, de la perte éprouvée sous l'influence de la dessiccation. Nous n'aurions pu le faire, *a priori*; à plus forte raison après avoir pris connaissance des expé-

riences de Shimidzu. Ce dernier a démontré que les nombres obtenus en opérant par les procédés Kumagawa et Suto sur la chair musculaire desséchée ne pouvaient être rapportés à ce même tissu frais. Il explique ces faits par une altération consécutive à la mise en œuvre des divers systèmes de dessiccation eux-mêmes : emploi de la chaleur, de l'alcool et de la chaleur combinés, du vide froid ; le meilleur moyen selon lui, et comme on pouvait s'y attendre, est le dernier, à condition d'agir vite et sur de petites quantités de substance.

En présence de telles conclusions, on peut demeurer surpris de voir tant d'auteurs persister à doser l'humidité des tissus en les desséchant par la chaleur. La différence entre le poids du tissu frais et du tissu ainsi desséché ne représente pas seulement l'eau, mais des pertes quelquefois sérieuses en principes volatils, éliminés non seulement par action purement physique, mais aussi sous l'influence de phénomènes chimiques ou même peut-être, dans certains cas, diastasiques et microbiens.

Le temps de la dessiccation et la température sont les deux facteurs essentiels de ces altérations. C'est en réduisant l'un et l'autre qu'on respectera au maximum l'intégrité des matières dérivées des êtres vivants. L'emploi du vide est recommandable, puisqu'il supprime l'action de l'air.

Nous avons insisté à diverses reprises, au cours de ce travail, sur ces considérations. Nous avons cru devoir les rappeler ici pour prévenir certaines objections.

Nos travaux de laboratoire ayant duré deux années entières, il nous était bien difficile de conserver inaltéré, pendant tout ce temps-là, un même échantillon de sang, pour en constituer la source de toutes nos prises d'essais, et cela même en appliquant les moyens ordinairement employés en vue de cette conservation : sang défibriné incoagulable, antiseptique, froid.

Le meilleur procédé de conservation, quand il ne doit pas dépasser quelques jours, est le froid à la température de la glace fondante. Nous avons largement utilisé ce moyen. Un autre procédé est de précipiter un volume ou un poids déterminé de sang ou de sérum dans la quantité optima d'alcool ou d'acétone, suivant qu'on adoptera la méthode à l'alcool ou à l'acétone.

Quand nous avons voulu comparer les deux méthodes,

nous avons ainsi simultanément opéré. Mais, surtout quand il s'agit d'une comparaison, il convient de ne pas attendre plus de deux ou trois jours; les dissolutions se modifient comme en témoigne leur décoloration progressive et peut-être les précipités sont-ils aussi le siège d'altérations.

Sans doute, de ces apparences, serait-il téméraire d'admettre implicitement une modification dans la nature chimique des liposes. mais le doute subsiste et à défaut d'une étude spéciale nous impose l'abstention.

CHAPITRE III

EXPOSÉ DU PRINCIPE DE LA MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT.

Avant d'entrer dans la description détaillée de chacune des expériences qui nous ont permis d'élaborer et d'établir notre technique, nous pensons utile d'en exposer le principe. Muni de ce guide, le lecteur saisira plus commodément les différentes phases des opérations et les liera facilement entre elles, s'il est déjà, à l'avance, en possession d'un tableau général d'ensemble.

Nous ne nous bornerons pas à une nomenclature sèche. Au contraire, nous montrerons *pourquoi* et nous dirons *comment* nous avons adopté les manœuvres dont l'ensemble constitue la méthode à laquelle nous avons donné le nom de *méthode Acétone-Savons d'argent*.

§ 1. — **Extraction totale des liposes — Isolement de chaque groupe de liposes : lécithinique, cholestérique, lipoïque.**

Nous avons longuement expliqué les raisons pour lesquelles l'emploi successif de l'acétone et de l'alcool a été choisi, par nous, dans le but d'extraire complétement les liposes du sang. Nous n'avons donc pas à y revenir. A partir de ce moment, le sang ou l'un de ses constituants est dissocié en trois fractions :

1° Solution acétone;
2° Solution alcool;
3° Précipité protéique.

La précision de la méthode dépend de l'extraction totale et, cette extraction étant totale, d'un dosage rigoureux de toute la substance extraite. Par conséquent, si nous voulons vérifier la rigueur de notre méthode, il convient, au cours de son application, de s'assurer qu'aucune fraction résiduelle des substances à doser ne reste en arrière dans les résidus abandonnés. Il faut, en outre, être certain non seulement que ces différentes substances à doser ont bien été extraites en totalité, mais encore qu'elles sont restées inaltérées pendant les manœuvres d'extraction, enfin que l'on ne dose en réalité que l'une d'entre elles, par conséquent qu'elle est bien pure quand on évalue son poids ou qu'en cas de mélange, le dosage n'intéresse que la seule substance à doser : tels le dosage de la lécithine par son phosphore, le dosage de la cholestérine par pesée directe.

Par conséquent comment, *a priori*, convient-il d'examiner chacune des trois fractions en présence desquelles nous sommes placé?

I. — Traitement de la solution acétonique.

Le plus simple est d'évaporer l'acétone. On le recueille par distillation en majeure partie, pour ne pas en laisser perdre une quantité notable. Une précaution élémentaire est d'opérer à basse température, surtout quand la liqueur, débarrassée de l'acétone, est devenue en grande partie aqueuse. Il faut penser, en effet, à la fragilité de certaines liposes, comme la lécithine.

Deux moyens s'offrent alors à nous comme traitement de cet *extrait aqueux-acétone* :

a) Son épuisement direct par l'éther ou son épuisement par l'éther après l'avoir basifié faiblement, sans intérêt puisque nous ne craignons pas les pertes en acides gras volatils, ou après l'avoir acidifié pour libérer, par exemple, les acides lipoïques existant sous forme de savons.

Le traitement de la liqueur aqueuse est le plus souvent suffisant, comme nous le verrons. On obtient alors une *solution acétone-éther*, dénommée ainsi pour spécifier son origine (traitement du produit primitif par l'acétone et du résultat par

l'éther) et une *portion aqueuse-acétone* (c'est-à-dire provenant d'une solution acétonique).

La *solution acétone-éther* donne par évaporation un extrait qui est séché et repris par l'éther anhydre et l'on obtient une nouvelle *solution acétone-éther anhydre*. Le *résidu acétone-éther anhydre*, entièrement soluble dans l'eau, est repris par un acide et par l'éther. Nos expériences nous montreront s'il en résulte un gain en acides lipoïques résiduels.

Traitement de la portion aqueuse-acétone : On examine d'abord comment elle réagit sous l'influence d'un acide et d'éther et l'on recherche les acides résiduels. On la traite encore par saponification directe à la manière de Grigaut pour y déceler, si faire se peut, la cholestérine.

b) Le *soluté-acétone* est évaporé jusqu'à siccité, la liqueur aqueuse notamment, à basse température, à 50°, cette température respectant les plus fragiles d'entre les liposes. Cela donne lieu à un *extrait-sec-acétone*.

Cet extrait est repris par l'éther absolu et fournit un *soluté acétone-éther* et un *résidu acétone-éther*. Ce résidu, traité par l'eau et un acide à chaud, puis par l'éther, est examiné au point de vue des acides résiduels.

II. — Traitement de la solution-alcool.

L'alcool, séparé par évaporation, fournit un *extrait-alcool* qui est séché à 50° et lavé à l'éther absolu, lequel, à son tour, conduit à une *solution alcool-éther absolu* et un *résidu alcool-ether absolu* qui, repris par l'éther, est examiné au point de vue des acides résiduels et de la cholestérine, comme il a été expliqué pour les autres résidus.

III. — Traitement des solutions-éther. saponification.

Finalement, nous nous trouvons en présence des deux solutions : *acétone-éther absolu n° 1* ou *acétone-éther absolu n° 2* et *alcool-éther absolu*. Elles sont mélangées et l'éther distillé. L'extrait, séché à 50°, fournit un *extrait acétone-éther absolu* dont nous déterminons généralement le poids. Il est saponifié par la potasse ou la soude alcoolique. L'alcool distillé, on reprend par l'eau acidulée qui met en liberté les

acides gras, et un lavage à l'éther fournit, d'une part, une *solution éther-acide* où doivent se trouver réunis les acides gras et l'insaponifiable, et, d'autre part, une *portion aqueuse-phosphore* où cet élément est issu de la lécithine saponifiée.

La première, séchée et reprise par l'éther anhydre, fournit un résidu qu'on examine de son côté et un nouvel extrait.

Dans la portion aqueuse on dose le phosphore d'où l'on déduit la lécithine. Dans certains cas, nous la soumettrons aux opérations de Grigaut en vue d'y déceler de la cholestérine résiduelle, en supposant qu'il y en ait.

IV. — Traitement de l'extrait-éther-acide issu de la saponification.

Jusqu'ici, pour en arriver à cet extrait, nous avons mis en œuvre les procédés classiques généralement utilisés par la plupart des chimistes pour isoler les acides gras et l'insaponifiable. Ces composés sont mélangés de certaines impuretés. Kumagawa et Suto, notamment, ont déterminé avec précision la nature et la quantité de quelques-unes de ces impuretés. Ils ont montré qu'on pouvait s'en débarrasser au moyen de l'éther de pétrole, lequel donne lieu à un extrait où se trouvent réunis à l'état de pureté les acides lipoïques et l'insaponifiable. Puis, neutralisant les acides par l'alcool potassique et reprenant encore une fois par l'éther de pétrole, ils y concentrent la cholestérine, dont le poids, retranché du premier extrait de pétrole, donne aussi celui des acides lipoïques, *par différence*.

Mais l'*extrait éther absolu acide* peut être traité de plusieurs autres manières différentes. Au lieu d'isoler la cholestérine dans un solvant, à l'égard duquel on rendra les acides lipoïques et les impuretés insolubles, on peut, au contraire, précipiter cette substance sous la forme de composés insolubles. Ainsi opèrent les auteurs qui, comme Bömer (102′) et Gérard, la transforment en éther acétique ou benzoïque insoluble dans l'alcool; ou, comme Windaus et, à son exemple, Mayer et Schaeffer, en font un complexe avec la digitonine. Alliant le procédé recommandé par Kumagawa et Suto à celui de Windaus, Mayer et Schaeffer, nous le rappelons, font d'abord

(102′) Bömer. *Z. f. Unters. d. Nahrungs u. Genussmittel*, 1898, p. 544.

un extrait de pétrole, puis une solution alcool où ils précipitent la cholestérine grâce à sa combinaison insoluble avec la digitonine, mais ils opèrent encore en dosant les acides gras par différence.

Entraînement des acides lipoïques dans une combinaison insoluble. — Un autre procédé est encore évidemment possible : celui d'engager les acides gras dans une combinaison insoluble au sein d'un solvant où la cholestérine elle-même restera en solution.

On peut appliquer ce moyen soit sur *l'extrait éther de pétrole* de Kumagawa et Suto, soit sur *l'extrait éther absolu acide*, à la condition de tenir compte des impuretés ou de s'en débarrasser au cours de l'opération. Nous avons pensé tout d'abord que pour isoler l'insaponifiable, il suffisait de précipiter les acides gras au sein d'un solvant commun aux deux séries de corps lipoïque et cholestérique. Nous avons imaginé que si l'on reprenait *l'extrait de pétrole* de Kumagawa et Suto par l'alcool et, qu'après l'avoir neutralisé, comme ils le font eux-mêmes, on pourrait, avec autant de simplicité, engager les acides lipoïques dans une combinaison insoluble au lieu de les faire passer, sous forme de savons alcalins, dans un soluté aqueux. Nous espérions même que le résultat serait ainsi plus facilement et plus rapidement atteint : bien entendu, le dosage des acides lipoïques continuant à s'effectuer, encore, par différence, après dosage de la cholestérine.

Puis, pour contrôler nos opérations, nous avons isolé les acides lipoïques de la combinaison où nous les avions insolubilisés, afin d'en comparer le poids à celui des acides lipoïques obtenus par différence.

Choix de la combinaison insoluble. — Par quel moyen rendre insolubles les acides lipoïques? Nous avons pensé qu'il suffisait de les transformer en savons d'un métal lourd, ceux-ci jouissant, tout au moins dans l'eau, d'une insolubilité complète, pour certains d'entre eux au moins. Notre pensée s'est portée en premier lieu sur les savons de plomb, rejetés aussitôt, ne serait-ce qu'en raison de la solubilité de l'oléate de plomb dans l'éther que nous faisons ultérieurement intervenir. Notre dévolu s'est ensuite fixé sur les savons d'argent.

Il convenait de discuter en même temps de l'emploi d'un solvant approprié, capable de dissoudre entièrement l'insaponifiable sans atteindre les savons d'argent. Le mieux, à notre avis, était de précipiter les acides lipoïques au sein même du solvant, commun à ces acides et à l'insaponifiable.

Nous nous sommes placé alors dans les conditions d'une double décomposition entre des savons alcalins et un sel d'argent soluble. Précisément l'alcool, solvant de l'insaponifiable, l'est également des savons alcalins et du nitrate d'argent. Nous n'avions donc en somme, en observant certaines règles, qu'à mélanger ce sel en solution alcoolique avec la solution alcoolique des acides lipoïques et de l'insaponifiable, les premiers étant préalablement neutralisés.

Remarquons que Kumagawa et Suto, reprenant par l'eau leurs savons alcalins, n'ont pas besoin de neutraliser au juste. Cette nécessité s'impose à notre système car, comme on le sait, un excès d'alcali décomposerait une partie du nitrate d'argent.

Pour justifier un pareil mode opératoire, la fin tolérant ici, incontestablement, les moyens, nous aurions pu nous contenter des résultats comparatifs qu'on trouvera plus loin. Nous avons préféré faire davantage et par des expériences préalables nous assurer :

1° Qu'une quantité déterminée d'un acide lipoïque dissout dans l'alcool, préalablement transformé en sel d'alcali, passe intégralement à l'état de sel d'argent et se trouve entièrement précipité sous cette forme ;

2° Qu'un mélange quelconque des trois acides lipoïques rencontrés dans le sang se trouve de même précipité à l'état de sel d'argent ;

3° Qu'un mélange, analogue à celui du sang, d'acides lipoïques et de cholestérine, se trouve nettement isolé, les premiers à l'état de sels d'argent, le second demeurant seul dissout dans l'alcool.

C'est pourquoi nous avons institué les recherches suivantes.

§ 2. — Dosage des acides lipoïques purs en solution alcoolique par formation de leurs savons d'argent.

Essais qualitatifs.

Essai 1. — Pour nous assurer de la sensibilité de l'action réciproque des solutions alcooliques de NO^3Ag et des savons alcalins, nous avons fait tomber une goutte de la solution d'argent, — toujours saturée à froid en raison de sa solubilité relativement faible, — dans des solutions alcooliques de savons alcalins répondant à peu près à la teneur des acides lipoïques dans le sérum sanguin, c'est-à-dire de 0,5 à 5 p. 100. Nous avons reconnu qu'en se plaçant dans de bonnes conditions de visibilité et sur un fond noir, notamment, une seule goutte de NO^3Ag fournit un louche immédiat qui se traduit en un précipité gélatineux si l'on augmente la quantité de NO^3Ag. Inversement une goutte ou plusieurs gouttes de solution de savon fournissent un précipité dans un excès de NO^3Ag. Par conséquent, ces réactions sont sensibles à une goutte près et le savon d'argent formé ne paraît soluble ni dans un excès de savon alcalin ni dans un excès de solution argentique.

L'alcool ne semble pas non plus, d'après cela, exercer la moindre influence.

Toutefois, nous avons voulu nous en convaincre et à cette fin avons exécuté l'épreuve volumétrique suivante en présence de l'alcool :

10 centimètres cubes NaCl N/10 sont versés dans un verre, puis 2 centimètres cubes d'une solution aqueuse NO^3 Ag N/10 préalablement mélangés et maintenus six jours en vase clos avec 6 centimètres cubes d'alcool à 95°. Après formation du AgCl, on ajoute une pincée d'acétate de sodium et 2 gouttes $Cr\ O^4K^2$ au 1/10.

Pour obtenir le virage du chromate, 7 cent. cubes 6 de la solution argentique N/10 sont nécessaires. La différence $10 - 7,6 = 2,4$ correspond à 0 gr. $0,108 \times 2,4 = 0$ gr.025 d'argent contenu dans les 2 centimètres cubes transformés à l'état de chlorure d'argent. C'est justement la quantité d'argent que nous avons prise avec les 2 centimètres cubes de NO^3Ag N/10.

Remarque. — Loin d'être défavorable, l'alcool présente, au contraire, l'avantage d'assurer l'insolubilité complète de Ag Cl formé, Sans l'alcool, en effet, Ag Cl resterait partiellement solubilisé dans l'excès de Na Cl où il est formé et troublerait les résultats.

Essai 2. — On mélange les solutions alcooliques suivantes d'acide stéarique, neutralisé par un excès de potasse, et de cholestérine.

Quand on additionne, en milieu alcool, un savon alcalin de potasse ou de soude et qu'on y ajoute, de plus, NO^3Ag alcoolique, on obtient immédiatement un précipité brun d'oxyde d'argent. Il est donc nécessaire, avant de faire intervenir NO^3Ag, de neutraliser le mélange précédent. Dans ce but, on y fait passer un courant CO^2 pur et sec qui précipite l'excès de potasse. Après filtration, lavage du précipité à l'alcool, on verse dans le filtrat un excès NO^3Ag qui donne immédiatement un précipité de savon d'argent blanc. Il faut opérer dans l'obscurité ou à la lumière artificielle, ou tout simplement enfumer le vase de précipitation ou l'entourer d'un papier noir servant en photographie.

La filtration est très rapide sur papier. Le filtrat doit contenir la cholestérine et l'excès de NO^3Ag, peut-être un peu de NO^3K, provenant de la double décomposition, très peu soluble dans l'alcool à froid.

Le filtratum réunit le stéarate d'argent et la plus grande partie de NO^3K.

Comme il est indispensable de se débarrasser de l'excès de NO^3Ag figurant au filtrat, il convient de n'en adjoindre qu'un excès très minime. En vue d'atteindre ce résultat, nous utilisons CrO^4K^2 et opérons *à la touche* en espaçant un certain nombre de gouttes d'une solution au 1/10^e, de ce sel, à la surface d'une feuille de papier blanc dit écolier. Une plaque de porcelaine conviendrait aussi. On arrête l'affusion de NO^3Ag dès l'instant où une goutte de liqueur transportée au moyen d'un agitateur fin, fournit une coloration rosée avec le chromate. On est d'ailleurs avisé de la fin prochaine de la réaction quand la légèreté du précipité s'accentue à chaque nouvelle affusion de NO^3Ag.

Le petit excès de NO^3Ag peut être détruit de différentes

manières. La plus adéquate à notre cas particulier est assurément l'adjonction d'un alcali en solution alcoolique, un excès de celui-ci ne nuisant aucunement à la suite des opérations. Une nouvelle filtration nous débarrasse de l'oxyde d'argent formé.

Sous l'influence d'une certaine quantité d'eau, le filtrat ainsi obtenu fournit un précipité abondant se réunissant rapidement à la surface. Ce précipité est soluble dans l'éther. Pour le constater il suffit d'ajouter l'éther à la solution alcoolo-aqueuse.

L'éther de pétrole, ajouté dans une autre portion de la même liqueur, dissout également le précipité, mais laisse un louche très notable au sein de la liqueur alcoolo-aqueuse. D'après cela, nous le jugeons inférieur à l'éther comme solvant de notre précipité insaponifiable.

Observation 1. — Si une portion du filtrat non filtré, contenant par conséquent l'oxyde d'argent brun, dont nous avons parlé, est additionné d'eau, celle-ci détermine un trouble prononcé blanc, mélangé d'oxyde d'argent. L'éther dissipe le trouble tout en respectant l'oxyde d'argent.

Observation 2. — Il faut limiter, autant que faire se peut, l'adjonction de l'alcali, car celui-ci, quand on exagère sa quantité, paraît redissoudre en partie le précipité brun d'oxyde d'argent.

De la première observation, on pourrait conclure qu'un traitement immédiat à l'éther suffirait à la captation complète du précipité blanc (insaponifiable). Cela n'est pas démontré. Mais un inconvénient sérieux serait l'emploi d'une très forte quantité d'éther, vu le volume à épuiser et qui pourrait être assez considérable de liqueur alcoolo-aqueuse. Il y a aussi à considérer la perte de l'alcool. Il est préférable, comme nous le verrons, quand il s'agit de dosage, de distiller la plus grande partie de l'alcool en vue de sa récupération. Mais alors de toute nécessité s'impose le rejet de l'oxyde d'argent, dont la réduction s'effectuerait au cours de cette distillation et donnerait lieu à divers inconvénients signalés plus loin.

Quoi qu'il en soit, les éthers d'épuisement recueillis dans les essais précédents, évaporés dans un petit cristallisoir, laissent une matière blanche, cireuse, soluble dans l'éther de

pétrole. Celui-ci, à son tour, abandonne un corps blanc, cristallisé en aiguilles disposées sous forme de houppes. Ces aiguilles sont très nettement visibles à la loupe et surtout au microscope.

Il n'en va pas de même, notons-le, avec une cristallisation née d'une liqueur-mère alcoolique : aux aiguilles sont alors substitués les cristaux tabulaires sous lesquels on observe généralement la cholestérine.

Tous ces essais, répétés sur les acides palmitique et oléique, fournissent les mêmes résultats.

Essai 3. — Quand on fait passer un courant de CO^2 pur et sec dans une solution alcoolique de savon placée à l'intérieur d'un vase ouvert à l'air libre, on observe au bout d'un temps variable, un quart d'heure s'il s'agit d'une solution un peu concentrée, un trouble abondant. Ce trouble disparaît d'ailleurs complètement et la solution redevient limpide si l'on rétablit son niveau avec de l'alcool. Cette observation prouve qu'il faut employer des solutions de savon suffisamment diluées et que, dans tous les cas, il est bon d'opérer dans un vase à goulot, de noter le niveau avant, pour le rétablir après, enfin de faire barbotter CO^2 en bulles aussi fines que possible afin de multiplier sa surface d'action, de réduire la durée de son intervention et de vaporiser le minimum d'alcool. C'est pourquoi nous utilisons des tubes capillaires formés tout simplement d'un tube de verre effilé dont la surface minime extérieure en contact avec la liqueur, permet un lavage rapide de ce tube, sans perte de liqueur, quand, l'opération terminée, on le retire du vase.

Epreuves quantitatives.

Sur la solution NO^3Ag-alcool. — Cette solution est préparée en additionnant d'un certain volume d'alcool une quantité suffisante de cristaux de nitrate d'argent pur, de manière à saturer l'alcool. On agite souvent, pendant plusieurs heures, ou bien encore on passe au bain-marie avec réfrigérant ascendant, puis on décante la liqueur parfaitement claire. On obtient une solution dont la conservation est pour ainsi dire indéfinie, en flacon bien bouché.

Dans le but de déterminer sa richesse, nous en prélevons 1 centimètre cube au moyen d'une longue pipette de précision dont la capacité totale est de 1 centimètre cube et graduée au 1/10e à 15°. La pipette et aussi la burette employées dans tous nos essais donnent XX gouttes pour 1 centimètre cube soit 1 goutte pour 0 cc. 05, ce qui équivaut, avec la liqueur Na OH N/10 à 0 gr. 0014 d'acide oléique(*) Une erreur d'appréciation d'une goutte entraîne donc une erreur par défaut ou excès de 0.0014 d'acide oléique.

Le volume de 1 centimètre cube mesuré avec l'instrument ci-dessus est évaporé au bain-marie par l'intermédiaire d'une capsule en porcelaine et la matière est chauffée jusqu'à commencement de fusion. Son poids est de 0 gr. 040. Le rapport $\frac{Ag}{NO^3Ag} = \frac{108}{170} = 0{,}6352$ nous donne le poids de l'argent correspondant, soit $0{,}6352 \times 0{,}040 = 0$ gr. 0254.

Comme vérification, ce poids 0 gr. 0254 est repris par une goutte NO^3H, de l'eau bouillante, et titré par voie humide, d'où l'on déduit le nouveau poids 0 gr. 0248. La concordance à 2,34 pour 100 près, est satisfaisante. Après plusieurs mois, ce titre n'a pas varié sensiblement.

Sur la solution KOH ou NaOH-alcool. — Cette solution est préparée avec de la potasse ou de la soude caustique à l'alcool pur et portée à 1 pour 100 environ.

A. — Acide oléique.

Cet acide, non saturé, offre aux altérations possibles, notamment oxydation, une facilité plus grande qu'en ce qui concerne ses congénères, acides stéarique et palmitique. Nous avons pensé préférable, à cause de cela, de le soumettre, le premier, aux expériences suivantes :

X gouttes d'acide oléique pur (marque Poulenc) sont pesés rapidement dans un matras jaugé de 50 centimètres cubes. Leur poids est de 0 gr. 2008. On les dissout dans l'alcool 95° vérifié neutre et on remplit le matras jusqu'au trait de jauge avec ce même alcool à la température de 15°

(*) $\left(\frac{\text{acide oléique}}{\text{Na OH}} = \frac{282}{40} = 7{,}0500\right) \times (0{,}004 = 0{,}0282) \times 0{,}05 = 0{,}0014$ d'acide oléique.

Epreuve 1. — Au moyen d'une pipette exacte, on prélève 5 centimètres cubes de cette solution, soit en poids 0 gr. 02008 d'acide oléique. On les fait écouler dans un petit matras de 100 centimètres cubes, on neutralise et sursature avec 1 centimètre cube de la solution alcoolique de soude vue plus haut. L'excès en est exclu par un courant de CO^2 sec. On filtre, on ajoute la solution alcoolique NO^3Ag préparée comme il a été dit, — mesurée, bien que ce ne soit pas indispensable ici, au moyen d'une longue pipette étroite, permettant d'apprécier facilement le 1/20e de centimètre cube, ou au moyen d'une burette graduée de même, — et dont la dose en léger excès est ici fixée à 1 cent. cube 2 par l'intermédiaire de CrO^4K^2. Une nouvelle filtration laisse sur le filtre en papier, dégraissé et mouillé d'alcool, l'oléate d'argent blanc. Lavé à l'alcool et à l'éther, il est entraîné dans un petit matras en verre de bohême, grâce à un jet d'eau froide, après avoir percé le filtre au moyen d'un gros fil de platine. Le filtre lui-même est introduit à son tour dans le matras, non sans avoir essuyé convenablement avec lui le fil de platine. On additionne le tout goutte à goutte de NO^3H au 1/3 puis d'un volume double d'éther. Après dissolution, on décante la portion aqueuse par en bas en la recevant dans un verre conique d'une capacité choisie.

On projette dans l'ampoule à robinet un jet d'eau en le faisant glisser le long des parois grâce à un mouvement giratoire de la pissette. On lave l'éther par renversement de l'ampoule et agitation. Les deux ou trois eaux de lavage ainsi produites sont reçues dans autant de verres coniques. L'éther est décanté par en haut dans un petit ballon où il sera distillé.

Quant à la portion aqueuse, le contenu du premier verre est replacé dans l'ampoule, ainsi que les contenus des verres suivants qui, auparavant et successivement, sont repassés dans le second et le premier verre. On ajoute à nouveau de l'éther dont les premières fractions ont aussi lavé successivement chacun des verres. L'ampoule est agitée comme précédemment, l'éther relavé et réuni au premier dans le ballon de distillation. On opère de même une troisième fois.

Tous les éthers distillés puis évaporés à 50° dans un petit cristallisoir laissent une goutte d'eau où est l'acide en émulsion. On chauffe jusqu'à poids constant et on trouve un poids

de 0 gr. 0226 pour 5 centimètres cubes, soit 0 gr.2260 pour 50 centimètres cubes. Repris par l'éther de pétrole et filtré sur amiante-coton (filtre et entonnoir préconisés par Kumagawa et Suto (*) on trouve un poids égal à 0 gr. 0206 soit 0 gr. 2060 pour 50 centimètres cubes, nombre en concordance avec la prise d'essai 0 gr. 02008. Il est cependant un peu fort par suite d'une impureté ou d'une légère oxydation que nous négligeons.

Cet extrait est repris par 25 centimètres cubes d'alcool neutre additionnés d'une goutte de phtaléine au 1/100. Le virage est obtenu grâce à 7 centimètres cubes de NaOH N/10, soit en poids d'acide oléique :

$\left(\frac{\text{acide oléique}}{\text{Na OH}} = \frac{282}{40} = 7{,}0500\right) \times 0{,}004 = 0{,}0282 \times 7$ centimètres cubes $=$ 0 gr. 01974. Une goutte de soude en excès donnerait le nombre $0{,}01974 + 0{,}0014 = 0{,}02114$. Celui-ci et le précédent encadrent la prise d'essai. Le premier seul doit être adopté, car il a entraîné le virage de la phtaléine. Il s'accorde d'ailleurs avec la prise d'essai à 1,70 pour 100 près. Comme on le voit, on retrouve l'acide oléique sur lequel on a fait porter les opérations décrites.

Titrage direct de la solution-alcool d'acide oléique par Na OH N 10. Essai concernant l'expérience précédente. — Ce titrage présente un certain intérêt : comparer ses résultats aux nombres précédents et permettre ainsi de vérifier la pureté de l'acide oléique mis en jeu.

Reprenons donc 5 centimètres cubes de notre solution-mère d'acide oléique. Ajoutons-y 25 centimètres cubes du même alcool avec lequel nous avons repris l'*extrait-pétrole* précédent, alcool d'ailleurs vérifié neutre, puis 1 goutte de phtaléine 1 p. 100, enfin NaOH N/10. Nous constatons qu'il en faut 7 centimètres cubes pour obtenir le virage, c'est-à dire exactement le volume déjà nécessaire au virage déterminé par l'acide oléique du savon d'argent.

Autre essai indépendant. Influence de l'étuve réglée à la température de 50° sur l'acide oléique. — Voulant opérer sur

(*) Cet entonnoir présente les caractéristiques suivantes : ouverture 75 m/m, tige capillaire 350 m/m, réservoir filtre cylindrique intermédiaire 35 m/m de hauteur sur 22 [illegible] de diamètre.

une quantité plus forte d'acide oléique, nous en avons pesé X gouttes ou 0 gr. 2102 dans un petit cristallisoir, et nous avons examiné l'influence de notre étuve réglée à 50° sur cet acide oléique pur, utilisé dans tous nos essais La pesée a été effectuée dans un petit cristallisoir. Observons en passant que ce poids est différent de celui déjà obtenu pour le même nombre de gouttes, poids égal à 0 gr. 2008. Ceci s'explique aisément par une simple variation de température.

Notre cristallisoir est placé à découvert dans l'étuve où nous avons séché tous nos acides lipoïques. Nous retrouvons exactement le même poids après 6 heures, puis après 8 heures de chauffe.

Nous avons dissous cet acide oléique dans 25 centimètres cubes d'alcool à 95° neutre. Avec une goutte de phtaléine au 1/100, le virage est obtenu exactement à 7 cent. cubes 45 ce qui correspond en acide oléique à $(7{,}0500 \times 0{,}004 = 0{,}0282) \times 7{,}45 = 0{,}2100$. L'accord est parfait avec la prise d'essai.

Remarquons qu'une goutte de NaOH N/10, soit 0 cent. cubes 05 de notre pipette, correspond à 0 gr. 0014 d'acide oléique. Si l'on prend deux fois 25 centimètres cubes de notre alcool neutre, chaque prise étant additionnée d'une goutte de phtaléine, I goutte de NaOH N/10 produit un virage immédiat dans la première. Il en est de même de I goutte de NaOH N/ 100 dans la seconde.

On voit que nos essais titrimétriques ont une rigueur très satisfaisante.

Epreuve 2. — 10 centimètres cubes prélevés sur les 50 où nous avons dissous X gouttes d'acide oléique, représentant par conséquent 0 gr. 0426 d'acide oléique, sont étendus à 40 centimètres cubes avec de l'alcool. Passage de CO^2 pendant 1 heure et demie après addition de 2 centimètres cubes Na OH à 1 p. 100. Précipité très notable. Filtration. Formation du savon d'argent. Filtrage facile du savon d'argent. Lavage à l'alcool dont les dernières portions ne donnent rien avec HCl. Nouveau lavage à l'éther absolu, puis continuation du traitement comme à l'habitude. L'acide oléique obtenu est égal à 0 gr. 0413, soit avec une approximation de 3,06 p. 100.

Remarque. — Dans les deux épreuves précédentes, on a pu

constater que le filtrat provenant de la séparation de l'oxyde d'argent brun, issu lui-même du traitement successif au nitrate d'argent et à la soude alcoolique, ne donne rien ni avec HCl, ce qui montre que tout l'argent a bien été précipité par la soude, ni avec une nouvelle affusion de soude, ce qui montre bien d'ailleurs que la première quantité de celle-ci avait bien produit tout son effet.

Epreuve 3. — Prise d'essai : V gouttes d'acide oléique pesant 0 gr. 1000.

Pour évaluer le volume total d'éther nécessaire à l'extraction aussi complète que possible de l'acide oléique isolé de son sel d'argent, nous avons lavé la liqueur aqueuse azotique trois fois de suite par le double de son volume en éther.

Le tableau suivant nous montre les poids obtenus :

1er Extrait-éther.	0 gr. 0886
1er Extrait-pétrole provenant de l'épuisement du précédent	0 gr. 0886
Obtenu par évaporation spontanée, puis 3 heures d'étuve.	Même poids dans les 2 cas.
2e Extrait-éther.	0 gr. 0106
2e Extrait-pétrole obtenu comme le précédent	0 gr. 0088
3e Extrait-éther (a été négligé).	0 gr. 0004
Total des extraits pétrole : 0,0883 + 0,0088 =	0 gr. 0971

L'acidimétrie portant sur ce dernier nombre nous donne 0, 0974.

La perte sur l'évaluation directe en poids est de 0, 1000 — 0, 0971 = 0, 0029, soit 2,90 p. 100. Elle est aussi de l'ordre de grandeur de celle qu'on peut observer ordinairement sur un dosage acidimétrique, lequel donne ici une approximation de 0, 1000 — 0, 0974 = 0, 0026 ou 2, 60 p. 100.

B. — Acide stéarique.

Epreuve 1. — Une prise d'essai de 0 gr. 1020 est mise dans notre étuve à 50° pendant 6 heures et ne change pas de poids. Elle est alors traitée exactement comme il a été expliqué par la méthode au nitrate d'argent et donne un extrait éther de pétrole = à 0 gr. 0989, ce qui comporte une perte de 0, 1020 — 0, 0989 = 0,0031 soit 3,03 p. 100.

Cet acide, repris par 25 centimètres cubes alcool neutre, et

titré avec Na OH N/10, en réclame 3 cent. cubes 55 correspondant à 0 gr. 1008 d'acide stéarique.

Si l'on s'étonnait de ce léger excès sur le poids trouvé, on se l'expliquerait facilement en songeant que la titrimétrie avec NaOH N/10 évalue l'acidité du milieu à une approximation (*) d'une goutte, chaque goutte ayant pour valeur, comme nous l'avons vu, 0 cent. cube 05 correspondant à :

$$\left(\frac{\text{Acide stéarique}}{\text{NaOH}} = \frac{284}{40} = 7{,}1000\right) \times 0{,}004 = 0{,}0284) \times 0{,}05 = 0{,}00142$$

D'où, si on la suppose en excès, 0,1008 — 0,0014 = 0,0994, valeur différente seulement de 0,0005 de celle obtenue par la balance.

Si l'on exécute à présent l'acidimétrie directe sur le même acide stéarique, une prise d'essai égale à 0,2079, dissous dans 25 centimètres cubes d'alcool, on trouve avec NaOH N/10, 7 cent. cubes 2, soit 7,2 × 0,0284 = 0,2044, évalué par conséquent à 1,68 p. 100 près, par défaut, résultat très satisfaisant si l'on tient compte à la fois des erreurs pondérales et titrimétriques qui peuvent s'additionner.

Epreuve 2. — Une seconde prise d'essai de 0 gr. 0610 d'acide stéarique nous fournit un extrait de pétrole égal à 0 gr. 0598, soit avec la pesée primitive, une différence de :
0,0610 — 0,0598 = 0,0012. L'approximation par défaut est donc de 1,96 p. 100.

L'acide palmitique pur n'a été soumis à aucune épreuve analogue. En revanche, nous l'avons attentivement étudié dans son mélange avec la cholestérine de même, d'ailleurs, que ses deux autres congénères lipoïques. Nous reviendrons sur cette étude particulière en commençant par l'acide palmitique. Nous verrons que les mêmes opérations auxquelles nous l'avons soumis sont parfaitement légitimées dans son cas, avec d'autant plus de force qu'elles se trouvaient compliquées par la présence de la cholestérine.

(*) Nous aurions pu diminuer cette approximation de 10 fois sa valeur en faisant usage de NaOH N/100. Nous n'avons pas jugé que ce fût nécessaire, puisque la titrimétrie, ici, n'a d'autre but que de constater son accord avec la balance et la pureté suffisante du produit acide pesé. Elle n'a aucune prétention au dosage rigoureux.

Acide Oléique.

	NUMÉROS DES ESSAIS			NOMBRES RAPPORTÉS A 100			MOYENNES	APPROXIMATION PAR DÉFAUT			MOYENNES
	I	II	III	I	II	III		I	II	III	
Prise d'essai	0,02008	0,0426	0,1000	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acide séparé du savon d'argent et pesé. . . .	0,02060*	0,0413	0,0971	»	96,94	97,10	97,02	»	3,06	2,90	2,98
Titration alcaline volumétrique du précédent . .	0,01974	»	0,0974	98,30	»	97,40	97,85	1,70	»	2,60	2,15

Acide Stéarique.

	I	II	I	II		I	II	
Prise d'essai	0,1020	0,0610	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Acide séparé du savon d'argent et pesé	0,0989	0,0598	96,96	98,03	97,49	3,04	1,97	2,50
Titration alcaline volumétrique du précédent . .	0,1008	»	98,82	»	98,82	1,18	»	1,18

*) Léger excès dû sans doute à une impureté négligeable dont la titrimétrie a fait justice. Toutefois, nous n'avons pas voulu faire entrer ce nombre dans les moyennes.

Résumé. — Les résultats précédents peuvent être réunis dans le tableau général suivant :

§ 3. — Dosage des acides lipoïques et de la cholestérine dans leur mélange.

La première partie du programme que nous nous sommes tracé page 145 est à présent un fait accompli. Il s'agit de savoir si les dosages, par la même méthode, de chacun des acides lipoïques considérés, mélangés avec la cholestérine, entraîneront un degré de précision comparable.

Commençons par l'acide palmitique que nous avons négligé dans la première partie.

A. — Acide Palmitique et Cholestérine.

Epreuve 1.

Soit la quantité : 0 gr. 1028. On la dissout dans l'alcool au bain-marie et l'on y ajoute 0 gr. 05 de cholestérine dissoute dans les mêmes conditions. 2 centimètres cubes NaOH-alcool à 1 p. 100 sont largement suffisants pour alcaliniser la liqueur (au tournesol) laquelle se trouble un peu et reste trouble, même à chaud.

Le courant de CO^2 suffit pour l'éclaircir. Quand on juge l'excès de soude transformé en carbonate, déposé sous forme d'une sorte de sable au fond du vase, on filtre sur papier. La liqueur limpide, additionnée de 5 centimètres cubes NO^3Ag-alcool, quantité nécessaire pour faire virer CrO^4K^2, est filtrée à son tour sur papier, lavée avec un peu d'alcool et à l'éther anhydre que l'on met en réserve. Le sel d'argent est bien blanc moyennant les précautions déjà indiquées : sa filtration est très rapide, à condition de le laisser reposer 1/4 d'heure environ pour lui permettre de se précipiter en partie. Il doit être lavé sur le filtre, à l'éther, afin d'en séparer l'alcool qui pourrait apporter un trouble dans l'action ultérieure de l'éther, après décomposition du sel par l'acide azotique. De plus, l'éther ayant un pouvoir solvant plus considérable que l'alcool sur la cholestérine, on sépare plus facilement la fraction de cette dernière restée adhérente au savon d'argent. Nous nous sommes assuré, d'autre part, que les lipoïdates d'argent sont insolubles dans l'éther.

Après avoir percé son filtre, le palmitate d'argent est introduit dans un matras de 100 centimètres cubes, sous l'action

énergique d'un jet de pissette d'eau froide, puis on y ajoute le filtre entier, de l'eau distillée jusqu'au quart du matras environ et NO^3H au 1/3 après avoir introduit un volume d'éther à 65° égal à deux fois celui de l'eau. Quelques gouttes seulement de NO^3H suffisent pour éclaircir immédiatement l'éther et l'eau, surtout si l'on a soin d'imprimer au matras un mouvement giratoire. Les éthers, lavés et distillés, laissent une matière blanche, dont on fait l'extrait de pétrole d'un poids trouvé égal à 0,1010. Dissous dans 25 centimètres cubes alcool neutre, il faut, pour le neutraliser 4 cent. cubes 05 NaOH N/10, soit en acide palmitique :

$$\left(\frac{\text{Acide palmitique}}{\text{NaOH}} = \frac{256}{40} = 6,4000\right) \times (0,004 = 0,0256) \times 3,95 = 0,1011$$

1 goutte Na OH N/10, soit 0 cent. cubes 05, = en acide palmitique $0,0256 \times 0,05 = 0,00128$.

La concordance des nombres entre la prise d'essai 0,1028 et la quantité trouvée 0,1010, — soit une approximation par défaut de 0,1028, — 0,1010 = 0,0018 ou 1,75 p. 100 — la pureté de l'acide palmitique obtenu, prouvée par sa titration volumétrique d'une part et son point de fusion de l'autre, montrent bien que le palmitate d'argent était lui-même pur, ou du moins exempt de cholestérine. Cette substance, par conséquent, est demeurée dissoute dans l'alcool de lavage et dans l'éther de lavage du précipité argentique.

Traitement du filtrat-alcool séparé du palmitate d'argent. — Ce filtrat contient non seulement la cholestérine en totalité, mais une certaine quantité de NO^3Ag et peut-être un peu de NO^3Na, bien que ce dernier seul soit réputé insoluble dans l'alcool.

Plusieurs moyens s'offrent à nous pour y doser la cholestérine. Dans des essais particuliers, que nous ne rapporterons pas ici, nous avons, par exemple, évaporé à sec la solution et l'avons reprise par l'éther de pétrole. On pourrait encore précipiter la cholestérine en la transformant en un complexe insoluble. Dans l'épreuve actuelle, nous avons pensé qu'il était tout d'abord préférable de nous débarrasser de l'excès d'argent. Le moyen le plus simple est de le précipiter par la

soude alcoolique sous la forme d'oxyde, attendu qu'un excès d'alcali ne saurait nuire à la suite des opérations. Un volume toujours réduit de soude alcoolique à 1 p. 100 suffit à éliminer complètement l'argent sous forme d'un oxyde brun. Il faut filtrer quelques minutes après, quand cet oxyde a commencé à se déposer. La filtration est très facile et rapide sur papier. Si l'on attendait quelques heures avant d'effectuer cette opération, l'oxyde d'argent serait réduit en partie ou en totalité sous forme d'argent métallique noir. Si l'on distillait l'alcool sans filtrer, la réduction s'effectuerait au cours de cette distillation. On verrait flotter des pellicules d'argent brillant à la surface du liquide et une partie de ce métal s'incorporerait à la solution à l'état colloïdal. Tout ceci donnerait lieu à des inconvénients dans l'extraction de la cholestérine.

Pourquoi l'oxyde d'argent ainsi préparé est-il susceptible de réduction avec l'influence complice, soit du temps, soit de la chaleur? Cette réduction n'est pas particulièrement surprenante, puisque, aussi bien, l'oxyde se trouve en milieu réducteur alcalin, éminemment favorisant, comme on sait. La cholestérine n'intervient probablement pas dans la réduction, l'alcool par lui-même n'y a sans doute aussi qu'une part bien problématique. On peut penser que des traces d'aldéydes, impuretés de cet alcool, y jouent le rôle essentiel.

Le filtrat étant débarrassé de tout l'argent qu'il pouvait contenir, on peut cette fois, soit y précipiter la cholestérine sous forme insoluble à la manière de Windaus, soit, seules interventions auxquelles nous nous soyons borné, évaporer à siccité et reprendre par un solvant approprié, ou bien encore, évaporer partiellement et épuiser par l'éther en présence de l'eau. Nous nous sommes arrêté à ce dernier parti dans l'épreuve présente. L'alcool est donc distillé dans un petit ballon puis, quand il en reste environ 15 à 20 centimètres cubes, on y ajoute un volume d'eau sensiblement égal. Ainsi l'alcool présente un degré voisin de 50. Ce degré a une grande importance. Grigaut a montré qu'il favorisait éminemment l'extraction totale de la cholestérine par l'éther. C'est pourquoi nous l'avons adopté à notre tour. L'eau provoque un trouble abondant de la liqueur alcoolique.

On reprend par 2 volumes d'éther à 65°, on lave à l'éther,

puis ce dernier à l'eau, on évapore et reprend par l'éther anhydre.

Le produit, séché et pesé, donne 0 gr. 0476. Sa cristallisation en aiguilles houppées et son point de fusion ne laissent aucun doute sur sa pureté.

Au lieu de reprendre l'*extrait éther 65°* par l'éther absolu pur, nous aurions pu reprendre cet extrait par l'éther anhydre, provenant du lavage du palmitate d'argent, mis en réserve. Nous ne l'avons pas ainsi utilisé, intentionnellement. Nous voulions, en effet, nous faire une idée de la quantité de cholestérine dont restait imprégné le palmitate d'argent. Nous avons donc évaporé à part cet éther et nous avons trouvé après dessiccation un résidu égal à 0 gr. 0019.

Nous avons repris ce faible résidu par $CHCl^3$, l'anhydride acétique et l'acide sulfurique, conformément à la technique colorimétrique de Grigaut. Nous avons ainsi trouvé un poids de cholestérine égal à 0 gr. 0016; ajouté à la quantité déjà évaluée 0 gr. 0476, nous obtenons 0 gr. 0492 de cholestérine totale, soit une approximation de 0,0500 — 0,0492 = 0.0008 et pour 100 = 1,6.

Remarque 1. — Reprenant les 0 gr. 0476 de cholestérine par le minimum d'alcool pour les dissoudre complètement, puis les précipitant dans la portion alcoolo-aqueuse de laquelle on les a retirés tout à l'heure, on obtient ainsi une sorte d'émulsion dans laquelle nous ajoutons 20 centimètres cubes d'eau.

Nous avons ainsi reconstitué, autant que possible, l'émulsion primitive, après l'avoir rendue notablement aqueuse. Ainsi le liquide, au lieu d'être principalement formé d'alcool à 50°, comme dans l'épreuve précédente, est une liqueur alcoolo-aqueuse, faiblement alcoolisée.

Un lavage à l'éther de cette nouvelle liqueur, imité de l'opération précédente, fournit un poids de cholestérine égal à 0 gr. 0335.

Comme on le voit, 1/3 de la cholestérine environ est resté dans les eaux de lavage. Ces eaux sont d'ailleurs franchement lactescentes. Cette lactescence s'explique certainement par la présence du résidu cholestérinique demeuré réfractaire à l'action de l'éther. Il y a là une émulsion ou une semi-émul-

sion qui ne s'explique pas par la présence de savons alcalins. Elle paraît uniquement due à l'alcalinité du milieu, d'où résulte une sorte d'équilibre dans la cohésion moléculaire, sur laquelle l'éther n'a aucune prise. Cet équilibre, de nature probablement purement physique, est détruit par l'alcool et dans tous les cas par les acides, comme nous pourrons le constater maintes fois. Reprenant, en effet, la liqueur par HCl dilué, la cholestérine émulsionnée se rassemble aussitôt en grumeaux surnageants. L'émulsion ainsi détruite, l'éther éclaircit complétement la liqueur. Traité à la manière ordinaire, finalement par l'éther absolu, on obtient 0 gr. 0130 de cholestérine qui, ajoutée à la première fraction 0 gr. 0335, donne 0 gr. 0465. Comme on le voit, on a bien pour ainsi dire repris en liqueur acide, la cholestérine qui avait été perdue en liqueur alcaline.

Remarque 2. — D'après cela, on peut se demander s'il n'y aurait point généralement intérêt à aciduler d'emblée la liqueur dans tous les cas. Nous étudierons cette question ultérieurement. Quoi qu'il en soit, nous pouvons dire dès à présent, et pour l'avenir, que si l'éther ne rend pas immédiatement limpide des liqueurs semblables, il y a lieu de supposer qu'il n'a pu capter toute la cholestérine.

Épreuve 2.

Prise d'essai d'acide palmitique : 0 gr. 0537; — Poids trouvé = 0,0519.

Prise d'essai de cholestérine : 0 gr. 0100. Cholestérine trouvée en reprenant par l'éther le mélange alcoolo-éther-aqueux-basique : 0 gr. 0981. Approximation = 0,0100 — 0,0981 = 0,0019, soit pour 100 : 1,90.

B. — Acide stéarique et cholestérine.

Épreuve 1.

Nous trouvons ici pour la cholestérine résiduelle provenant de l'éther anhydre de lavage du stéarate d'argent : 0 gr. 0036.

Cholestérine totale trouvée : 0 gr. 0495, sur une prise d'essai de 0,0500.

Acide stéarique trouvé = 0,1401, sur une prise d'essai de 0,1406.

Épreuve 2.

Prise d'essai = 0,0622
Cholestérine prise d'essai = 0,0100
Cholestérine trouvée = 0,0097

Un accident ne nous a pas permis de doser l'acide provenant du stéarate d'argent.

C. — Acide oléique et cholestérine.

Nous ne donnons, en ce qui concerne cet acide, qu'une seule épreuve, mais nous pensons que, jointe à celles dont l'acide oléique a déjà fait l'objet, ces résultats suffisent a entraîner la conviction de la légitimité de notre méthode pour le cas considéré.

Résumé. — Nous réunissons l'ensemble des nombres obtenus, dans le tableau général ci-contre relatif au § 3.

§ 4. — **Réflexions générales sur le dosage de la cholestérine et des acides lipoïques par la méthode Acétone-Savons d'argent.**

Dans le chapitre précédent nous avions affaire à un mélange d'acides lipoïques et de cholestérine à l'état de pureté.

Remarquons qu'à partir du moment où Kumagawa et Suto ont repris par l'éther de pétrole, leur extrait d'éther absolu provenant de la saponification et de l'acidification successives de leur premier *extrait-éther-absolu*, ils ont montré avoir, dans leur solution de pétrole, les acides lipoïques et la cholestérine, à l'exclusion de toute impureté. C'est pourquoi ils se trouvent autorisés à évaluer les acides gras par différence, après avoir déterminé le poids de leur extrait éther de pétrole et dosé la cholestérine.

Nous en pourrions faire tout autant dans notre méthode, à la condition de partir, comme eux, du même extrait de pétrole. Il nous serait loisible alors de doser uniquement

Acide Stéarique.

	ÉPREUVES		RAPPORTS A 100		MOYENNES	APPROXIMATIONS		MOYENNES
	I	II	I	II		I	II	
Prise d'essai	0,1406	0,0622	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Acide séparé du savon d'argent et pesé	0,1401	»	99,64	»	99,64	0,36	»	0,36
Titration alcaline volumétrique du précédent . .	0,1400	»	99,57	»	99,57	0,43	»	0,43
Cholestérine (prise d'essai) . .	0,0500	0,0100	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Cholestérine trouvée . .	0,0495	0,0097	99,00	97,00	98,00	1,00	3,00	2,00

Acide Palmitique.

	I	II	I	II		I	II	
Prise d'essai	0,1028	0,0537	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Acide séparé du savon d'argent et pesé	0,1010	0,0519	98,24	96,64	97,44	1,76	3,36	2,56
Titration alcaline volumétrique du précédent . .	0,1011	»	98,34	»	98,34	1,66	»	1,66
Cholestérine (prise d'essai) . .	0,0500	0,0100	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Cholestérine trouvée . . .	0,0492	0,0097	98,40	97,00	95,20	1,60	2,30	1,95

soit la cholestérine, soit l'ensemble des acides lipoïques, après avoir transformé ces derniers en savons d'argent.

On pourrait nous objecter qu'alors nous perdrions l'avantage de notre méthode, qui est précisément de doser parallèlement et chacun de leur côté le groupe des acides lipoïques d'une part, la cholestérine de l'autre.

Nous pensons que pour des recherches rigoureuses, cette objection n'aurait pas de valeur et, qu'au contraire, peser l'extrait de pétrole en premier lieu, quantifier ensuite par notre méthode le groupe des acides lipoïques et l'insaponifiable, ajouter ces deux derniers nombres et s'assurer que cette somme reste égale au poids de l'extrait éther de pétrole, est un contrôle qui ne serait pas à négliger, puisque rien ne doit être négligé dans toute recherche délicate.

Cette vérification aurait tout au moins l'avantage d'assurer l'opérateur contre des fautes de technique, des pertes passées inaperçues, des altérations possibles, ou quelque autre incident opératoire.

Cela posé, considérons le dosage soit de l'insaponifiable, soit du groupe des acides lipoïques, en partant de l'extrait éther de pétrole, de poids connu. Nous verrons qu'il nous est possible de le soumettre aux manipulations suivantes :

1° Dissolution dans l'alcool comme le font Kumagawa et Suto.

2° Neutralisation exacte de cette solution alcoolique au moyen d'une solution alcoolique de potasse ou de soude titrée, en présence de phtaléine du phénol. Kumagawa et Suto neutralisent de même en ajoutant un excès de potasse, comme nous l'avons d'abord exécuté nous-même, ainsi qu'on l'a vu dans les expériences précédentes et qu'on le reverra plus loin dans quelques-unes de nos expériences d'études préliminaires.

3° Séparation des acides gras au moyen d'une solution alcoolique de nitrate d'argent, dont on ajoutera un très léger excès, témoigné par la formation de chromate d'argent. Kumagawa et Suto mesurent autant d'eau qu'ils avaient employé d'alcool et ajoutent cette eau à leur solution alcoolique.

4° Filtration, d'ailleurs très rapide et immédiate, pour séparer le précipité argentique. Lavage de ce précipité argentique avec un peu d'éther absolu, mis de côté pour le

faire servir ultérieurement. Kumagawa et Suto font passer leur mélange dans une ampoule à robinet et l'épuisent à plusieurs reprises par de l'éther de pétrole.

Sur le dosage de la cholestérine.

5° Nous allons poursuivre le dosage de notre cholestérine dans le filtrat alcool, afin de le comparer au dosage de Kumagawa Sutto.

Le filtrat comprend la cholestérine et l'excès de nitrate d'argent non décomposé. 1 ou 2 centimètres cubes de soude ou de potasse à 1 p. 100 suffisent pour en éliminer l'argent. Une seconde filtration, également rapide, suivie d'un lavage avec quelques centimètres cubes d'éther, nous débarrasse à la fois du métal et nous permet de récupérer la cholestérine restée avec l'alcool d'imprégnation. Cet éther est joint au premier éther de lavage vu plus haut. De ce moment, on peut distiller l'alcool soit en totalité, soit en partie. La suite de nos expériences nous apprendra qu'il est plus simple de pousser la distillation jusqu'à siccité, de sécher à 100° et de reprendre alors directement par l'éther de pétrole, à condition que le résidu soit parfaitement sec.

Pendant ce temps-là, Kumagawa et Suto distillent l'éther de pétrole provenant des lavages de leur liqueur alcoolo-aqueuse. Leur extrait de pétrole, à leurs propres dires, ne représente jamais l'insaponifiable pur. Ils sont obligés de le reprendre par une solution alcoolique de potasse, de sécher à nouveau, moyennant quoi un second extrait de pétrole leur fournit l'insaponifiable pur.

En ce qui nous concerne, après avoir ajouté les deux éthers absolus résiduels, dont nous avons parlé, à notre dernier extrait d'alcool, l'évaporation de cet éther entraîne les dernières traces d'alcool. Une reprise par l'éther de pétrole donne l'insaponifiable pur.

A première vue, nos manipulations paraissent plus nombreuses, mais à la vérité, considérées dans l'ensemble et étant donnée leur simplicité, on peut les assimiler, sous le rapport du temps, à celles de Kumagawa et Suto. Quant à leur précision, elle sera également démontrée.

Mayer et Schaeffer, il est vrai, en utilisant le procédé de

Windaus, ont simplifié la technique de Kumagawa et Suto-mais ils déduisent toujours les acides lipoïques par *différence*, Ce gain de temps ne saurait toujours compenser la certitude fournie par un contrôle.

Sur le dosage des acides lipoïques.

Dosons maintenant le groupe des acides lipoïques. Il faut effectuer les opérations suivantes :

1° Traitement des savons d'argent par l'acide nitrique en présence de l'éther.

2° Séparation et évaporation de l'éther.

3° Reprise de l'extrait éthéré soit par l'éther anhydre, soit par l'éther de pétrole.

En admettant qu'on puisse trouver plus simple et plus rapide la méthode de Kumagawa et Suto quant à l'isolement de l'insaponifiable, nous croyons qu'on ne pourrait formuler pareille notation en ce qui concerne le dosage des acides lipoïques, auquel on pourrait se borner, en déduisant l'insaponifiable par différence, tout comme Kumagawa et Suto obtiennent, inversement, les acides lipoïques de la même façon.

On pourrait s'étonner de notre insistance à comparer ici le principe de notre méthode avec celle de Kumagawa et Suto adaptée à l'analyse du sang par Shimidzu.

Notre intention est, en effet, de développer les explications que nous avons fournies aux objections dont notre méthode (103) a été l'objet, au moyen d'arguments tirés principalement de la méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu. Nous avons déjà répondu à ces objections. Notamment, nous avons insisté sur ce que toutes les opérations qui nous sont communes avec celles de ces savants, sont des opérations banales, employées communément par tous les chimistes (dans l'analyse courante des graisses en général et des graisses du sang en particulier), bien avant leur emploi par Kumagawa et Suto, qui les ont empruntées eux-mêmes à leurs devanciers et dans l'ordre même, où ces devanciers les avaient uti-

(103). Sur une méthode de dosage des lipoïdes dans le sang. *Comptes R. Soc. de Biol.*, 31 janvier 1914, p. 176. — Sur le dosage des acides lipoïques dans le sang. Séance du 14 mars 1914, p. 446. — A propos de la méthode acétone-savons d'argent. Séance du 28 mars 1914, p. 537.

lisées. Elles n'appartiennent donc pas au génie inventif de Kumagawa-Suto-Shimidzu qui ont, au surplus, d'autres mérites à leur actif. Il suffit de consulter la première partie de ce travail pour être convaincu de la vérité de nos assertions. Les mérites de Kumagawa et Suto ressortent principalement des études patientes, rigoureuses, minutieuses et poussées à fond des méthodes imaginées avant eux, c'est-à-dire :

1° L'extraction des graisses par saponification directe des tissus, imaginée par Lieberman et Szekely et d'ailleurs inapplicable au sang, d'après Shimidzu.

2° L'extraction des graisses par l'alcool, puis par l'éther, et leur saponification ultérieure, procédé classique, tombé depuis le milieu du XIX^e^ siècle, dans le domaine de la chimie pure et appliquée.

Nous revendiquons, au contraire :

1° Le remplacement de l'alcool par l'acétone, dont nous avons montré les avantages dans l'application de ce dernier à la précipitation des matières protéiques.

2° Les dosages parallèles et séparés des acides lipoïques, préalablement transformés en sels d'argent, et de la cholestérine isolée de son côté. Ceci forme le fond et l'originalité de notre méthode.

On ne trouve rien de semblable dans Kumagawa-Suto-Shimidzu, qui se bornent à isoler la cholestérine, avec plus de rigueur, il est vrai, que leurs devanciers, en employant des procédés déjà connus.

Quant à la précision de notre méthode, nous verrons dans les pages suivantes qu'elle ne laisse pas d'être aussi grande que celle de Kumagawa et Suto.

§ 5. — **Traitement direct, par le Nitrate d'argent en solution alcoolique, de l'extrait-éther-absolu acide neutralisé, sans passer par l'éther de pétrole.**

Nous n'avons pas tardé à concevoir qu'il était possible de simplifier les opérations en supprimant l'une d'entre elles, à savoir le passage par l'éther de pétrole de l'*extrait éther absolu acide*, indispensable dans la méthode de Kumagawa et Suto.

Comme on sait, ces savants purifient l'*extrait éther absolu acide* en le dissolvant dans le pétrole, lequel élimine les diverses impuretés dont l'extrait éther est souillé : acide lactique, principes azotés, pigments, etc..

Dissolvons donc directement l'*extrait éther absolu acide* dans l'alcool à 95°, où se trouvent alors réunies, avec les corps à doser, les diverses impuretés énumérées et sans doute d'autres encore.

Nous inspirant de l'action des sels des métaux lourds sur les solutions aqueuses bio-organiques, nous avons pensé que le nitrate d'argent agirait semblablement en milieu alcoolique. On sait, par exemple, que lorsqu'on veut doser l'urée dans l'urine, on utilise la propriété précipitante des acétates de plomb sur la plupart des principes azotés autres que l'urée. En même temps, on peut constater que l'intensité de la nuance de l'urine a diminué, preuve qu'une partie des pigments a été entraînée par le sel de plomb, lequel d'ailleurs se colore en même temps. Ces sels des métaux lourds exercent une sorte de *laquage* sur ces composés complexes. Il y a là sans doute une adhérence ou, si l'on préfère, une imprégnation intermoléculaire d'ordre mécano-physique et non chimique. Les composés les plus simples restent en solution.

Il en est bien ainsi, comme nous avons pu le constater, quand on verse une solution alcoolique de nitrate d'argent dans la solution alcoolique des principes enlevés par l'alcool à l'*extrait acide éther absolu*. Celle-ci, comme l'extrait lui-même dont elle provient, est d'une coloration jaune ambrée plus ou moins foncée.

Elle se décolore après intervention de NO^3Ag. Par contre, le précipité est d'un jaune allant, suivant les cas, du jaune pâle au jaune ocreux. Naturellement, quand on met en liberté l'argent en le retransformant en nitrate par le moyen d'un léger excès de NO^3H dilué, les acides lipoïques et toutes les autres impuretés qui les accompagnent, sont mis simultanément en liberté.

Comme nous le savons, cette libération s'effectue en présence d'eau et d'éther. Un partage a lieu entre ces deux liquides; l'éther s'empare de la totalité des acides lipoïques et se trouve coloré en jaune par la plus grande partie des pigments dont la plus minime est retenue par l'eau.

Quant aux principes azotés, nous verrons comment ils se partagent, de même que l'acide lactique.

Quoi qu'il en soit, on obtient ainsi un extrait éthéré peut-être moins impur que celui dont nous étions partis. En admettant qu'il le soit autant, nous nous trouverions à présent dans la situation primitive, sauf élimination de la cholestérine. Faisant seulement intervenir l'éther de pétrole à ce moment sur ce nouvel *extrait-éther*, il n'en dissout que les acides lipoïques purs. De fait, quand cette manipulation a été bien conduite, quand l'extrait a été bien desséché, la solution éther de pétrole est parfaitement incolore et le poids de cet extrait représente bien le poids des acides lipoïques, ainsi qu'il sera démontré plus loin.

Remarque. — Il est nécessaire de bien laver à l'eau les éthers d'épuisement destinés soit à capter la cholestérine, soit à capter les acides lipoïques dans leurs liqueurs aqueuses, ne serait-ce qu'en vue de les débarrasser d'acide minéral, comme l'acide nitrique. Pour y arriver plus simplement, nous avons imaginé d'ajouter aux eaux de lavage quelques gouttes d'une solution de citrate de soude, qui est absolument sans action, comme nous le montrerons, sur les acides lipoïques. En revanche, l'acide nitrique et l'acide lactique — s'il est présent — transformés en nitrate et lactate de soude, sont enlevés par l'eau en même temps que l'acide citrique mis en liberté, lequel est insoluble dans l'éther.

§ 6. — **Traitement de la première liqueur-aqueuse nitrique d'où sont extraits les acides lipoïques et l'insaponifiable.**

Ce traitement a pour but de doser le phosphore, considéré comme représentant le phosphore total de la lécithine. On admet que la première solution *éther absolu* contient tout son phosphore sous forme de lécithine distéarocholinique. Après saponification et reprise par l'eau, le phosphore lécithinique s'y trouve entièrement réuni sous la forme de phosphate. Nous le doserons conformément à la technique de

Villiers, conseillée par Grimbert et Laudat, avec quelques petites modifications de détail qui nous ont été suggérées dans le cas où, se trouvant obligé de faire abstraction de la centrifugation, on sépare par filtration sur papier, le précipité phosphomolybdique.

CHAPITRE III

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT.

Le principe de notre méthode étant exact dans les conditions artificielles que nous venons d'examiner, nous allons maintenant passer aux expériences que nous avons faites sur le sang lui-même. Elles nous conduiront à l'adoption définitive de notre méthode.

Après avoir adopté un principe de méthode, on doit s'efforcer de rendre celle-ci aussi simple que possible, en alliant la simplicité à la rigueur et sans exclure nonobstant ce qu'on entend par « élégance scientifique ». Nous avons recherché assidûment ces trois qualités. De toutes, la précision est primordiale quand il s'agit d'une méthode de dosage.

Pour contrôler la précision d'une méthode de dosage, nous connaissons trois moyens principaux qu'il convient d'employer tous les trois quand c'est possible :

1° Comparer les résultats de la méthode étudiée à une méthode reconnue bonne, appliquée simultanément.

2° Contrôler la méthode en quelque sorte sur elle-même, autrement dit ne jamais abandonner un résidu sans s'assurer qu'il ne renferme aucunement de la substance à doser.

3° Avant de commencer l'analyse, ajouter à une partie de la matière un poids connu de la substance à doser et retrouver ce poids à la fin, en plus de celui du produit naturel qui est simultanément déterminé sur une autre fraction de la matière.

Nous userons de tous ces moyens de contrôle, simultanément ou non, mais en accordant la préférence aux deux premiers en raison de la difficulté d'incorporer des liposes, de

quelque nature qu'elles soient, au sang ou à l'un de ses composants et surtout sous la forme où doivent s'y rencontrer les liposes naturelles.

Kumagawa et Suto, dans leur travail, ont usé uniquement du second moyen de contrôle, en tenant pour inexacts ou suspects tous les procédés préconisés avant le leur. Si nous tenons pour démontrée, avec la plupart des auteurs contemporains, l'exactitude de ce dernier, nous pourrons l'adopter pour en comparer les résultats à ceux obtenus par notre méthode.

Dans chacune de nos expériences, nous n'avons pu faire la comparaison totale de tous les éléments liposiques dosés, en raison de ces faits que telle méthode reconnue exacte pour tel élément liposique ne saurait être prise comme type ou terme de comparaison pour les autres, soit parce qu'elle ne vise qu'un des éléments pour lequel elle a été créée, soit parce que son exactitude n'est prouvée que pour certains d'entre eux. C'est ainsi que la méthode de Kumagawa et Suto vise uniquement les acides lipoïques et la cholestérine, que la méthode Grigaut a été inaugurée seulement en vue du dosage de la seconde de ces substances.

Il est vrai qu'il est permis d'associer ces méthodes, de construire avec elles des techniques nouvelles, à l'exemple de Grimbert et Laudat, de Mayer et Schaeffer, etc. On peut encore utiliser séparément les diverses méthodes. Nous n'avons négligé aucun de ces procédés.

Nous décrirons nos expériences en les divisant en deux séries. La première comprend le groupe des expériences préliminaires exécutées avec le sang du cheval. Beaucoup d'entre elles resteront incomplètes. C'est de leur ensemble qu'il nous sera permis d'entreprendre des expériences définitives et d'application dont le sang humain, finalement, sera l'objet : elles formeront la seconde série. De la généralité des résultats obtenus, après critique approfondie, nous tirerons la technique finale.

Expériences sur le sang de cheval.

Premier Groupe d'Expériences.

Les expériences préliminaires ont été faites avec le sérum du cheval, dont il est facile d'avoir de fortes quantités. Dans des expériences d'études il est, en effet, préférable d'élever les doses à manipuler. Et, d'autre part, il est possible aussi d'avoir plusieurs échantillons du même sang, simultanément, sous la main.

Ce sang est conservé dans la glace jusqu'à coagulation et séparation du sérum. 30 centimètres cubes de ce sérum sont aspirés à quatre reprises différentes au moyen d'une pipette. Les deux dernières prises d'essai sont traitées à l'autoclave, suivant le procédé Grigaut (voir expériences 3 et 4). On fait écouler chacune des deux premières d'un léger mouvement giratoire, dans 300 centimètres cubes d'acétone, eux-mêmes placés à l'intérieur de deux verres coniques, de capacité suffisante. Les précipités se forment aussitôt, on agite vivement avec des agitateurs en verre. Au bout de quelques minutes, les précipités, blancs et fins, se rassemblent au fond des verres. L'acétone surnageant est limpide et vivement coloré en jaune d'or. A partir de ce moment, on peut filtrer, comme on le verra par la suite.

Mais dans ces premières expériences, influencé par les textes des auteurs qui précipitent le sérum dans l'alcool, et l'y maintiennent pendant 12 heures, nous avons conservé nos précipités au contact de l'acétone durant toute une nuit, les verres étant naturellement fermés par des cristallisoirs, le tout recouvert d'une cloche à bords rodés assujettie sur une glace épaisse. Dans notre procédé, ce repos prolongé est en réalité absolument inutile.

Nous étudierons successivement le contenu de chacun des deux verres dont le second offre la particularité suivante :

Voulant éprouver la précision de notre méthode, au moins partiellement, grâce à l'application du contrôle n° 3 dont il est fait mention p. 171, nous avons dissous 0 gr. 06 de cholestérine pure dans un peu d'acétone prélevé du second verre,

puis nous avons mélangé les deux fractions avant d'y verser le sérum. Ce poids de 0 gr. 06 pour 30 centimètres cubes de sérum correspond à 2 par 1000 de sérum. Sur la valeur de ce contrôle nous nous expliquerons à propos de l'expérience qui lui est relative.

EXPÉRIENCE 1

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction.

Extraction acétonique. — Considérons le *verre n° 1* sans cholestérine ajoutée.

On filtre par décantation sur un filtre en papier sans pli, dégraissé. Le précipité reste presque tout entier dans le verre. On lui ajoute de l'acétone autant de fois qu'il en faut, après agitation et repos, pour obtenir un liquide parfaitement incolore, soit au total 1 litre d'acétone environ.

Dans d'autres expériences préliminaires, non rapportées ici, on recevait les filtrats acétoniques dans quatre vases différents, puis ces filtrats étaient distillés dans le vide (précaution jugée plus tard superflue), en commençant par le dernier filtrat obtenu, c'est-à-dire le quatrième. Cette manière de faire avait l'avantage de distiller d'abord les solutions les moins riches en produits solubles et en eau, les premiers filtrats étant au contraire chargés d'eau et de produits solubles. Les premières distillations marchaient ainsi très rapidement et très commodément. De plus, les matières solides étaient soumises pendant le minimum de temps à l'action de la chaleur et à l'action de l'eau. Enfin, un autre avantage était d'éviter la formation de mousses qui n'apparaissent que tout à fait à la fin quand on poursuit la distillation jusqu'à disparition totale de l'acétone. Avec ce solvant, ces mousses, d'ailleurs, sont éphémères et fragiles; elles ne prédisposent pas aux pertes par entraînement. Au contraire, avec l'alcool, elles sont tenaces, durables, prédisposent aux entraînements si l'on n'use d'un dispositif tout particulier pour les détruire au fur et à mesure de leur production.

Les distillations dans le vide étaient effectuées au moyen d'un appareil continu; les liqueurs distillées étant remplacées

petit à petit dans le ballon distillatoire grâce à une aspiration réglée. Les vapeurs étaient condensées dans un réfrigérant descendant puis dans deux vases successifs entourés de glace, en communication avec une trompe aspiratrice, le ballon distillatoire, de son côté, étant placé au bain-marie vers 50°.

L'examen comparatif de la distillation dans le vide de l'acétone et de l'alcool donne lieu à quelques autres remarques.

Au début, ces liquides s'écoulent parfaitement neutres.

En ce qui concerne l'alcool, il présente une réaction acide avant son évaporation complète. Ce phénomène ne s'observe pas avec l'acétone, sauf quand on pousse la distillation jusqu'à l'eau, au-delà de l'acétone distillé.

L'acétone, en effet, distille avant l'eau à laquelle il est mélangé. Celle-ci demeure au fond du ballon, trouble et laiteuse. Ce trouble, que l'éther évanouit, est évidemment dû aux liposes insolubles.

L'alcool entraîne l'eau au fur et à mesure de son évaporation et laisse par conséquent un résidu sec. En même temps s'éliminent les acides gras volatils, qu'on pourrait retenir au besoin, il est vrai, si on le jugeait utile, par l'adjonction de carbonate ou bicarbonate de soude ajouté à la liqueur primitive ou aux liqueurs alcooliques.

Du côté acétone, au contraire, ces acides volatils commencent seulement à s'éliminer avec l'eau quand on pousse l'évaporation jusque là et, par conséquent, l'avantage reviendrait à l'alcool à ce point de vue, puisque seuls les acides non volatils à poids moléculaire élevé, autrement dit les acides lipoïques, nous préoccupent ici. Ce léger avantage n'arrive pas à infériorisier tous ceux que nous avons relevés à l'actif de l'acétone, parmi lesquels la durée de distillation extrêmement rapide doit entrer naturellement en ligne de compte. Au reste, les acides volatils sont éliminés ultérieurement par le fait de leur volatilité même.

Dans l'expérience actuelle, nous nous sommes dispensé de l'emploï du vide. Nous distillons l'acétone à la pression ordinaire en commençant par les filtrats les plus pauvres. Bien entendu, toutes ces opérations sont effectuées au bain-marie, à une température ne dépassant pas 90°. Il y a lieu de supposer qu'en présence de l'excès du solvant les subs-

tances dissoutes ne sont pas altérées. On maintient le niveau de l'eau à un degré inférieur à celui de l'acétone, pour éviter les surchauffes.

A moins d'évaporer à l'air libre et de perdre le solvant, de même est-il possible d'opérer avec le procédé à l'alcool. La durée de l'opération est alors environ dix fois plus longue et la température plus élevée, avoisinant le point d'ébullition de l'eau, si l'on veut voir se condenser l'alcool en quantité suffisante dans le col de la cornue ou dans le tube de dégagement du ballon, suivant le choix de l'appareil distillatoire.

Quand la plus grande partie de l'acétone a été éliminée, on a continué son évaporation dans le vide entre les températures extrêmes de 35 à 45°. On s'arrête dès que les premières portions d'eau commencent à se condenser. A ce résidu nous donnons le nom d'*extrait-aqueux-acétone*.

Notre but, comme le fut celui de la plupart de nos devanciers, est d'arriver à dissoudre toutes les matières grasses hématiques dans l'éther, de façon à en faire un extrait éthéré. En conséquence, trois alternatives se présentent à l'esprit pour faire passer les liposes de l'*extrait-aqueux-acétone* à l'état de dissolution éthérée.

1° Epuiser directement cet extrait par l'éther.

2° Epuiser ce même extrait par l'éther après l'avoir séché à basse température.

3° Epuiser ce même extrait, séché à basse température, d'abord par l'alcool, cet alcool, pouvant être chargé d'une proportion de liposes d'une autre provenance, comme nous allons le voir. En déduire l'extrait alcool, qui sera lui-même, finalement, traité par l'éther.

Nous avons étudié toutes ces opérations dans les expériences suivantes.

Extraction à l'alcool. Formation de l'extrait-alcool. — Le précipité protéique laissé par l'acétone au fond du verre conique est noyé dans un volume suffisant d'alcool bouillant, titrant 95° Baumé. On s'est assuré de la neutralité de cet alcool et de sa parfaite volatilité. Le tout est entraîné dans un petit ballon par de nouvelles affusions d'alcool et chauffé 4 heures au bain-marie au réfrigérant ascendant. On filtre alors sur le

papier où l'on avait déjà passé l'acétone. L'alcool en sort limpide avec une couleur légèrement ambrée. Il dissout donc certaines substances demeurées réfractaires à l'action de l'acétone.

Divers savants se sont proposés d'épuiser les tissus vivants de leurs matières grasses en les soumettant à l'action successive d'un certain nombre de solvants. Les anciens employaient fréquemment l'alcool et l'éther. Moins loin de nous, Rosenfeld (104) a étudié l'extraction alternative par l'alcool et le chloroforme. D'autres chercheurs contemporains ont repris les extractions par l'éther pur (Pflüger) (105) ou combiné à l'alcool (Bogdanow) (106) ou encore l'action des solvants précédant une digestion artificielle (Dormeyer) (107).

Glikin (108), puis Kumagawa et Suto (109), ont soumis ces méthodes, qui toutes portaient sur des tissus desséchés et réduits en poudre, à une critique sévère. Les deux derniers ont démontré que de tous les solvants qu'ils ont essayés : alcool éthylique, méthylique, éther acétique, chloroforme, acétone, benzène, éther absolu, éther de pétrole, seul l'alcool, même d'un degré tombé à 80 B., est capable, au bout d'un temps suffisant et à la température voisine de l'ébullition, d'exercer une extraction totale des matières grasses.

Tous les essais de Kumagawa et Suto ont porté sur des poudres musculaires, traitées par les solvants à une température voisine de l'ébullition dans leur appareil spécial d « extraction à chaud ».

En ce qui concerne l'acétone, ils considèrent son action comme favorable et notent que, pour sa part, il est capable de fournir, après une extraction de 8 heures, un extrait-éther égal à 62 p. 100 de l'extrait total.

D'un autre côté, nous donnerons pour le sang, les nombres que nous avons ainsi obtenus, nous-même, avec l'acétone. Ils sont très supérieurs au taux précédent. Nous trouvons notamment 91,14 p. 100 dans le cas de l'expérience n° 1 du

(104) *Loc. cit.* p. 78.
(105) *Loc. cit.* p. 78.
(106) *Loc. cit.* p. 115.
(107) *Loc. cit.* p. 78.
(108) Glikin. Untersuchungen zur Methode der Fettbestimmung in tierischem material. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, **95**, 107, 1903.
(109) *Loc. cit.* p. 79.

2e groupe (page 210 en renvoi) et 94,67 p. 100 expérience 1 du 5e groupe (page 233 en renvoi).

Evidemment, si nous nous étions arrêté à cette propriété tout de même imparfaite de l'acétone, nous n'aurions pas retenu ce corps pour édifier notre technique, mais nous avons insisté sur toutes les autres propriétés qui font de l'acétone une substance de choix quand l'alcool lui succède, notamment la précipitation des protéines, phénomène qui n'a pas été considéré ni par Kumagawa et Suto ni par l'adaptateur de leur méthode à l'analyse du sang, Shimidzu.

Quoi qu'il en soit, l'impuissance de l'acétone comme extracteur complet est un fait démontré, au moins à une température voisine de son point d'ébullition et aux températures inférieures. Nous nous sommes demandé, rappelons-le, si, aux températures supérieures, égales notamment à celle du point d'ébullition de l'alcool, le pouvoir solvant de l'acétone ne varierait pas suivant une loi croissante. Des expériences mériteraient d'être instituées à cet égard. On pourrait d'ailleurs généraliser le problème et rechercher si, à une même température, les solvants miscibles à l'eau ont un pouvoir d'extraction dépendant ou non de leur nature chimique.

Pratiquement et sans appareils spéciaux, nous laisserons à l'acétone le rôle particulier que nous lui avons assigné et nous complèterons son action extractive en faisant intervenir l'alcool sur le précipité protéique fourni par l'acétone.

C'est ce que nous allons faire ici. Nous avons filtré l'acétone en faisant tomber le précipité protéique sur le papier, puis nous continuons son épuisement au moyen de l'alcool bouillant dans un entonnoir à filtration chaude, en le maintenant et en le laissant noyé dans l'alcool chaud pendant 10 minutes environ, grâce à l'emploi d'un caoutchouc muni d'une pince obturant la tige de l'entonnoir. L'opération est recommencée jusqu'à ce qu'une goutte, évaporée sur un verre de montre, ne ternisse plus ce verre. Il faut environ 300 centimètres cubes d'alcool pour arriver à ce résultat.

Nous pensons qu'en opérant comme précédemment, à défaut d'appareil permettant l'emploi d'un volume réduit et constant de solvant, l'acétone étant d'autre part supprimé, l'alcool seul servant de solvant extracteur, le volume de ce dernier nécessaire à l'épuisement serait très supérieur à la

somme des volumes acétone et alcool lorsqu'on associe jusqu'à épuisement individuel l'action de ces deux liquides.

L'alcool ayant joué jusqu'au bout, après l'acétone, son rôle d'extracteur, est d'abord distillé à pression ordinaire comme l'acétone. On observe vers la fin de l'opération la formation de petites parcelles ocreuses nageant au sein du distillatum ou se précipitant au fond. A partir de ce moment, on peut poursuivre la distillation dans le vide. A part quelques soubresauts, elle marche assez régulièrement et assez vite. On fait le vide avec la trompe, mais d'une façon intermittente. On évapore ainsi à pression réduite en condensant par la glace. Ici on n'observe pas de mousses grâce à l'absence d'eau préalablement entraînée par l'acétone. Le résidu est solide, jaune ambré et blanc par place. Il n'y a pas de cristallisation apparente à l'œil.

Il serait intéressant d'étudier la nature de cet extrait, de l'extrait-acétone et des extraits-éther dérivés parallèlement des deux premiers. Nous réserverons ces examens à propos des expériences suivantes.

Formation de l'Extrait-Ether-total. — Sur le résidu albuminoïde qui vient d'être épuisé par l'alcool, on fait passer deux fois de l'éther absolu de manière à le noyer chaque fois entièrement. Le premier *filtrat-éther* est écoulé et reçu dans le ballon où se trouve le *résidu-alcool*. Il est porté au réfrigérant ascendant à peu près un quart d'heure, puis est versé sur le *résidu acétonique*.

Le deuxième filtrat éther sert à laver le résidu alcool et est joint au précédent. Ces éthers se colorent en jaune en paraissant dissoudre surtout la matière jaune du résidu-alcool. Les éthers de lavage du résidu-protéique, passaient, eux, absolument incolores.

Le ballon du résidu alcool est lavé deux fois avec l'éther à 65° du Codex; il est joint à l'*extrait-aqueux-acétone* qui bientôt, après s'être éclairci, se partage en deux couches nettes, toutes deux colorées, la couche aqueuse étant la plus colorée, mais aussi la moins considérable.

Dans le ballon du résidu alcool reste la substance blanche et une petite couronne jaunâtre; également des parcelles de

couleur ocre qui flottaient lors de la distillation de l'alcool.

4 à 5 centimètres cubes d'eau ajoutés à ce *résidu-alcool* semblent le dissoudre entièrement. Cette dissolution est substituée dans le ballon acétonique à la liqueur éthérée qui s'y trouvait et qui, elle-même, a trouvé place dans une ampoule à robinet d'une capacité de 250 centimètres cubes. De plus, la solution aqueuse précédente vient rejoindre à son tour cette dernière liqueur éthérée; enfin, en dernier lieu, une deuxième et une troisième eau de lavage des deux ballons où se trouvaient primitivement le *résidu-alcool* et le *résidu-acétone*.

L'ampoule est agitée fortement à plusieurs reprises après l'avoir inclinée de manière à ce que les liquides évacuent complètement la tige, où leur mélange serait défectueux. L'appareil est replacé lentement et progressivement dans la position verticale, non sans avoir attendu le partage des solutions éthérée et aqueuse. Celle-ci continue à être la plus colorée. Elle est d'ailleurs très limpide, comme la portion éther elle-même. Au niveau de partage existe toutefois un anneau très léger de couleur ocreuse.

On se débarrasse de la portion aqueuse en la recevant dans un verre conique; on la remplace dans l'ampoule par de l'eau distillée qu'on ajoute au moyen d'une pissette en lui faisant balayer la paroi de l'ampoule grâce à un mouvement giratoire. On introduit ainsi un volume d'eau égal environ à la moitié du volume de l'éther. On lave l'éther à l'eau en agitant, tout en respectant les précautions décrites antérieurement. Ces deux eaux de lavage sont reçues dans deux nouveaux verres coniques. L'éther est alors transvasé, par le goulot de l'appareil, dans un petit ballon de distillation. Puis la majeure partie de l'éther de ce ballon est évaporée au bain-marie. Le reste est versé dans un petit cristallisoir en verre d'Iéna, évaporé presque totalement au bain-marie à 50° et séché à l'étuve à la même température jusqu'à poids constant, température requise par tous les analystes en matières grasses.

Le résidu demeuré au fond du cristallisoir est une matière d'aspect gras, colorée en jaune un peu foncé et liquide à chaud. Repris par l'éther anhydre, il reste une matière solide, hétérogène, blanche et brunâtre par endroits, d'ailleurs peu

abondante. Il y aura lieu d'examiner la nature de ce résidu. Pour le moment, nous nous sommes contenté d'évaporer l'éther après l'avoir filtré sur amiante avec toutes les précautions décrites à propos des extraits éthérés. Le cristallisoir est pesé couvert; le poids de l'*extrait-éther-anhydre* ainsi obtenu est de 0 gr. 1528, soit 5,09 p. 1000. C'est une matière solide d'aspect cireux; on l'introduit dans un petit ballon au moyen d'un peu d'éther dont d'autres portions servent à laver le cristallisoir à trois ou quatre reprises différentes. L'éther est évaporé au bain-marie, puis dans le vide.

II. — Saponification de l'Extrait-Éther total.

Sur le résidu, on ajoute environ 30 centimètres cubes d'une solution KOH N/5 alcoolique (alcool 95°).

On porte à l'ébullition pendant 3 heures. L'alcool est évaporé. On reprend par un peu d'eau bouillante et par de l'acide nitrique dilué (Grimbert et Laudat) jusqu'à excès mesuré au tournesol. Le tout est versé dans une ampoule à robinet. On y ajoute deux fois autant d'éther du Codex, après en avoir lavé le ballon de saponification. L'agitation donne lieu, après repos, à une couche éthérée colorée en jaune ambré et à une liqueur aqueuse presque incolore. La liqueur aqueuse est lavée à l'éther et les éthers eux-mêmes lavés à l'eau et réunis en suivant les prescriptions maintes fois décrites. Les éthers, à leur tour, sont évaporés et séchés avec les précautions indiquées. La liqueur aqueuse nitrique sera traitée d'autre part.

Traitement de l'Extrait-éther-aqueux acide. — Repris par l'éther absolu, cet extrait en solution, filtré et évaporé, laisse un résidu pondéralement représenté par 0 gr. 1372, soit 4,57 p. 1000. Il est composé des acides lipoïques, de l'insaponifiable et de diverses impuretés.

Nous reviendrons à la fois sur la nature de ces impuretés et sur la nature du résidu indissous par l'éther absolu.

Dans la description du principe de notre méthode, nous avons exposé le raisonnement qui nous a conduit au traitement particulier de l'extrait-éther-absolu auquel nous venons d'aboutir. Par conséquent, en conformité de ces explications,

reprenant cet extrait au moyen de l'alcool 95°, nous arrivons à le dissoudre, à l'intérieur d'un Bécher-glass profond, couvert d'un verre de montre, à la chaleur douce d'un bain-marie, en évitant l'ébullition. Puis, prudemment, nous neutralisons la liqueur par une solution KOH à 1 p. 100 dans l'alcool à 95°, jusqu'à bleuissement net du papier tournesol rouge, dont l'extrémité d'une très fine lamelle est placée au contact du liquide pour en éprouver la basicité. La solution reste limpide.

Un courant CO^2, bien sec, est dirigé au sein de la liqueur, grâce à l'emploi d'un tube effilé capillaire. Cette disposition a le mérite de diviser CO^2 sous forme de bulles très fines dont l'action est à la fois plus rapide et évite des pertes de liquide par entraînement. Il convient d'ailleurs d'opérer dans un Bécher-glass assez profond. Si l'excès de potasse est très faible, la précipitation est rapide et un réchauffement tempéré au bain-marie rassemble immédiatement le carbonate ou le bicarbonate au fond du vase. La filtration est immédiate quand on a soin d'opérer par décantation. Le filtrat est reçu dans un matras de 250 centimètres cubes, mais son volume ne dépasse pas 100 centimètres cubes, si l'on a lavé le filtratum avec de l'alcool bouillant.

Sur la nature du précipité provoqué par CO^2. — Ce filtratum est entièrement soluble dans l'eau et présente tous les caractères d'une combinaison de la potasse avec l'acide carbonique. Séché et repris par l'éther, ce dernier fournit un résidu par évaporation. La solution aqueuse, acidifiée par HCl étendu, ne fournit aucun trouble, et d'ailleurs un épuisement à l'éther ne donne rien quand on évapore ce solvant. De ce fait, aucune perte en lipose ne saurait être retenue.

Le précipité carbonique obtenu est jaunâtre et détermine une décoloration corrélative partielle du filtrat alcoolique. C'est donc une dépigmentation par entraînement sur laquelle il n'est pas utile d'insister.

III. — Précipité argentique. Formation des savons d'argent

Le filtrat alcool contient donc en totalité les acides lipoïques sous forme de savons potassiques et l'insaponifiable. Sa

légère coloration montre néanmoins qu'il n'est pas pur. Il contient en outre, évidemment, la majeure partie des impuretés mentionnées à propos de l'extrait-éther absolu.

Il faut maintenant faire intervenir le nitrate d'argent en solution d'alcool à 95°, préparé d'après les indications déjà formulées (page 149).

Soit au moyen d'une pipette, soit par l'emploi d'une burette à robinet, on fait écouler d'abord en mince filet le *nitrate d'argent-alcool* dans la solution alcoolique où l'on veut précipiter les savons d'alcalis sous forme de savons d'argent insolubles. Une seule goutte suffit pour donner un nuage très apparent. En vue d'observer la fin de la réaction, on pourrait attendre l'éclaircissement de la région supérieure du liquide et s'arrêter dès l'instant où quelques gouttes de liqueur argentique ne donneraient plus lieu à aucun trouble. Cette manière de procéder serait assez longue. Il est préférable d'user du procédé à la touche consistant à distribuer sur une lame de porcelaine vernie ou tout simplement sur un papier dit *écolier* un certain nombre de gouttes CrO^4K^2 à 10 p. 100; avec un fin agitateur on prélève vers la fin de la réaction une goutte du mélange et on l'apporte sur une des gouttes de chromate. En présence du moindre excès de nitrate d'argent, une coloration rosée très nette se manifeste aussitôt.

Remarque sur l'action de la lumière. — Le précipité, au moment de son apparition, est blanc ou du moins d'un jaune safran assez clair. Comme il fallait s'y attendre et comme nous l'ont prouvé des essais préalables, il se fonce et noircit assez rapidement sous l'influence de la lumière. Ce phénomène de réduction entraîne sans doute une oxydation ou tout au moins une altération des acides gras. Il convient donc de se mettre à l'abri d'une telle éventualité. C'est extrêmement facile en enveloppant le matras réactionnel, jusqu'au goulot, d'un papier noir inactinique employé en photographie. A la vérité, il n'est plus possible, dans ces conditions, d'observer l'intérieur du matras. Cela ne présente aucun intérêt, surtout quand on sait par avance, au cours d'une série d'analyses, la quantité approximative de NO^3Ag qui doit intervenir. A chaque adjonction de liqueur argentique, on agite vivement le matras en lui imprimant un mouvement de giration. On

prélève une goutte de liquide que l'on porte sur une autre goutte de CrO^4K^2. Après virage de ce dernier, il suffit d'abandonner le matras à lui-même, jusqu'à ce que le dépôt argentique en gagne le fond, c'est-à-dire pendant quelques minutes.

Après quoi il faut filtrer par décantation sur un papier dégraissé et lavé aux acides (papier de Berzélius). La filtration est très rapide, surtout si l'entonnoir est à longue tige capillaire. On prend la précaution d'en entourer la partie évasée avec du papier noir inactinique ou bien tout simplement de le couvrir de noir de fumée en l'exposant à une flamme fumeuse. Pendant la filtration on le couvrira d'une plaque de verre ou d'un verre de montre également enfumé en dessus, ou tout simplement d'un verre coiffé de papier noir.

Le filtrat passe limpide et est immédiatement reçu dans un second matras qu'il est inutile, celui-là, d'entourer de papier.

Quand on opère à la lumière artificielle et notamment à la lumière électrique, les précautions indiquées, afin de prévenir l'altération du précipité argentique, sont tout à fait inutiles. Pendant le jour, si l'on dispose d'une chambre noire, on peut se passer de papier inactique. Toutefois, ce dernier moyen est encore le plus simple puisqu'il évite tout transport d'appareil.

Au surplus, en raison de la densité du précipité argentique, son dépôt s'effectuant vite, on peut filtrer presque immédiatement. On gagne ainsi du temps, l'action de la lumière peut être considérée comme nulle, ainsi que celle de l'alcool d'ailleurs, si l'on voulait admettre l'action chimique secondaire de celui-ci.

IV. — Traitement du Précipité Argentique.

Nous sommes dès lors en présence d'un filtratum argentique et d'un filtrat alcoolique. Examinons chacun d'eux, dont le traitement peut-être exécuté parallèlement et simultanément.

Il faut bien laver le précipité, lorsqu'il est encore dans son matras, en le secouant énergiquement avec de petites quantités d'alcool à 95°. Les dernières portions d'alcool servent à le faire tomber tout entier dans l'entonnoir de filtration. On

termine les lavages sur l'entonnoir, pour éviter l'emploi de trop grandes quantités d'alcool, par un peu d'éther absolu, avec lequel on noie à deux ou trois reprises le précipité argentique en l'agitant avec un fin agitateur. L'éther passe limpide et vite en entraînant les dernières traces d'insaponifiable. Il est reçu à part dans un petit flacon désigné à cet effet.

Après lavage, le filtre, saisi entre les mors d'une pince, est placé sur un petit entonnoir à douille un peu large, douille engagée soit dans le goulot d'un matras, soit directement dans celui d'une ampoule à robinet. On perce le fond du filtre avec un fil de platine de calibre assez gros pour être rigide et, grâce à quelques énergiques jets d'eau froide, on arrive à détacher du filtre tout le précipité. En général, il est préférable, à la fois pour éviter toute perte et gagner du temps, après avoir libéré le filtre de la plus grande partie de son précipité, de l'introduire directement dans le matras. Ce dernier sera alors employé, à l'exclusion de l'ampoule, dont le rôle n'interviendra que secondairement.

Aussitôt après, on ajoute une quantité suffisante d'eau, quand celle de balayage paraît insuffisante (en tout 15 à 20 centimètres cubes). A partir de cet instant, il faut faire usage d'un acide dilué pour libérer les acides gras et de l'éther pour les dissoudre. On peut ajouter en premier lieu l'acide ou l'éther, cela n'a pas d'importance. Ce qui importe, c'est de ne pas marquer d'intervalle appréciable dans l'adjonction des réactifs et, surtout, dans l'adjonction de l'acide. Celui-ci, en effet, marque la destruction des savons d'argent sensibles à la lumière.

Sur la nature du précipité argentique. — Dans l'exposé du principe de notre méthode, nous avons montré qu'une solution alcoolique de savons alcalins, traitée par une solution alcoolique de nitrate d'argent, donne naissance, dans les conditions décrites, à une précipitation suffisamment complète des acides stéarique, palmitique et oléique, sous forme de stéarate, palmitate et oléate d'argent insolubles. Nous pourrions peut-être nous autoriser de ces faits pour admettre la précipitation aussi complète de ces acides dans le cas particulier du sang. Ce serait nous exagérer la portée de ces pre-

mières conclusions. Les vérifications expérimentales nous permettront de reconnaître que des traces d'acides lipoïques échappent à cette action, dans certains cas. Nous avons crû reconnaître qu'il fallait surtout éviter l'action de la lumière, et nous verrons quelles sont les autres précautions à prendre pour obtenir une précipitation pratiquement exacte, d'une exactitude égale et même supérieure à celle qui a été observée avec nos milieux artificiellement composés. Nous retrouverons quand il y aura lieu, avec l'insaponifiable, les acides résiduels échappés à l'action de NO^3Ag, et nous pourrons en tenir compte. Kumagawa et Suto avaient déjà noté l'existence constante, d'une petite quantité d'acides gras, échappant à l'action de la potasse, au cours du traitement pétrolifère destiné à dissoudre l'insaponifiable, à l'exclusion des acides gras retenus par l'alcali. Un excès même de celui-ci, n'empêche pas une certaine quantité non négligeable d'acides lipoïques, de suivre la destinée de l'insaponifiable, où ces acides sont retrouvés avec lui, dans l'extrait de pétrole.

Ces phénomènes d'incomplet isolement d'un corps défini, organique ou minéral, sont bien connus des chimistes, même quand ils les engagent dans des combinaisons reconnues pour être tout à fait insolubles. Insolubles, en effet, elles le sont; mais dans des conditions bien déterminées, et, notamment, quand elles sont exemptes de mélange avec d'autres composés solubles. Cet ensemble définit un milieu particulier pour lequel interviennent, envers chacun des corps qui le constituent, des phénomènes d'équilibre, variables avec le solvant, la température, la composition du milieu, etc... Tous les phénomènes de la nature paraissent obéir à de telles lois, limites d'équilibre, sans doute analogues entre elles quant à leur principe général. Pour purifier ou isoler un élément ou une combinaison définie, il suffit très souvent de répéter les opérations de purification ou d'isolement. Ce sont là des procédés bien connus.

Avant l'intervention du nitrate d'argent sur l'alcoolat où se trouvaient réunis l'insaponifiable et les savons alcalins, primitivement originaires du sang, nous avons pu constater une coloration légèrement ambrée de cet alcoolat, par quoi, de

ce fait seul, il devenait impossible d'affirmer qu'il fût exempt d'impuretés. Par conséquent, ces impuretés doivent se retrouver soit dans le précipité d'argent, soit dans le nouvel alcoolat dont il est privé après filtration, ou bien peut-on encore admettre un partage entre les deux. Si l'on en jugeait d'après la coloration, il faudrait supposer que l'alcoolat en est à peu près dépourvu puisqu'il est presque incolore. Ce serait donc parmi les savons d'argent qu'il faudrait rechercher les impuretés.

D'autres arguments viennent à l'appui de cette hypothèse. La couleur du précipité est plus foncée que celle du précipité correspondant des acides lipoïques en solution pure, lequel est blanc, quelquefois à peine jaunâtre. En second lieu, l'*extrait éther absolu* dont on est parti ne pouvait pas être considéré comme exclusivement composé des acides lipoïques et de l'insaponifiable. Les analystes des matières grasses savent l'éther, même absolu, incapable d'isoler ces substances à l'état de pureté. Kumagava et Suto ont déterminé la nature de certaines d'entre elles : acide lactique, substances azotées, notamment créatine.

D'autre part, on sait avec quelle facilité les sels des métaux lourds, quand leur métal est précipité en liqueur aqueuse, entraînent à leur suite les matières dites extractives et les pigments. Nous avons cité l'exemple de l'acétate de plomb avec lequel on se débarrasse préalablement de la presque totalité des substances azotées, sauf l'urée, objet d'un dosage dans l'urine. Dans le milieu alcoolique où nous faisons intervenir l'azotate d'argent, un mécanisme similaire ne saurait-il être invoqué?

Sur le choix de l'acide libérateur. — Dans le but de libérer les acides lipoïques, il faut faire appel au concours d'un acide. Dans l'analyse des matières grasses, on emploie le plus souvent les acides minéraux susceptibles de libérer complètement les acides gras d'une part, et d'autre part très solubles dans l'eau et peu dans l'éther. Les plus utilisés sont l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique. Le composé argentique du premier est presque insoluble, celui du second l'est tout à fait. Ce dernier nous offrirait donc la possibilité de dégager les acides lipoïques de leurs sels d'argent en

maintenant ce dernier métal sous la forme insoluble, l'éther s'emparant des premiers au fur et à mesure de leur mise en liberté.

Dans nos premiers essais nous n'avons pas eu à nous louer de l'emploi de l'acide chlorhydrique, dont l'action ne paraît pas suffisamment rapide. Mais ne l'ayant pas étudié à fond, nous ne saurions le condamner systématiquement avant examen plus attentif. En revanche, on peut retirer tout profit en utilisant les propriétés solvantes de l'acide azotique sur l'argent.

Nous inspirant de Grimbert et Laudat, nous avons précédemment employé cet acide pour décomposer les savons alcalins. A présent, il va nous servir pour décomposer nos savons d'argent, faire repasser l'argent à l'état d'azotate d'argent très soluble dans l'eau et libérer les acides gras immédiatement solubles dans l'éther.

L'acide azotique, dilué au 1/10e environ ou même plus concentré, jusqu'au tiers, est ajouté goutte à goutte et chaque fois le matras vivement agité. Quand on opère en dehors de la présence de l'éther, il est facile de s'assurer du moment où il y a un léger excès d'acide, grâce à un agitateur humide de la liqueur, et porté sur un papier bleu de tourne-sol. Le virage rouge vif est caractéristique. En présence de l'éther, l'opération est moins facile. On peut néanmoins, en plongeant l'agitateur à travers l'éther jusqu'au niveau de l'eau et en le retirant vivement, obtenir souvent une indication assez nette. Nous verrons ultérieurement des moyens plus précis.

Sous l'influence de NO^3Ag, la décomposition du précipité argentique et la mise en liberté des acides gras est presque immédiate. Il en est de même pour leur solubilité dans l'éther. Quand on a bien opéré, le filtre est parfaitement blanc et ne présente aucune tache provenant de l'action de la lumière sur le composé argentique d'abord répandu à sa surface.

La réaction parfaitement terminée, on introduit, par l'intermédiaire d'un entonnoir, les deux liquides dans une ampoule à séparation. On lave le matras et le filtre à plusieurs reprises avec l'éther du Codex à 65°. L'eau n'est pas colorée, mais en revanche l'éther présente une teinte jaune ambré. De là, il n'est pas trop téméraire de conclure à la

libération simultanée d'une partie des impuretés entraînées par le précipité argentique et à leur passage dans l'éther avec les acides gras. De ce fait encore, n'est-il pas logique de supposer la nature non basique des dites impuretés, puisqu'elles ne sont pas retenues par l'excès d'acide nitrique. A la vérité, à nous en tenir simplement à un seul pigment, la bilirubine, nous savons qu'elle jouit plutôt de propriétés acides, comparable en cela à la plupart des lipochromes.

Les liqueurs aqueuse et éthérée sont décantées chacune de leur côté après avoir été lavées, la première à l'éther, la seconde à l'eau, conformément au *modus operandi* connu. Nous en verrons plus tard un perfectionnement (chapitre IV, page 253).

A basse température et pour la plus grande partie, l'éther est distillé, puis transvasé dans un petit cristallisoir, évaporé presque à sec au bain-marie tiède, enfin à l'étuve à 50° jusqu'à poids constant. Dans des essais antérieurs, nous séchions dans le ballon lui-même, d'abord au moyen du vide, puis d'un courant d'anhydride carbonique sec. Les résultats du dosage ne sont pas meilleurs, du moins quand on a pris les précautions nécessaires déjà signalées à propos de l'assèchement des acides gras à l'air.

On obtient, après dessiccation complète, une matière grasse, de couleur jaune assez foncée, liquide à 50°, de consistance un peu pâteuse à une température inférieure.

Formation de l'extrait-éther de pétrole. — L'éther de pétrole ne dissout qu'une fraction du résidu précédent. De ce liquide on verse environ 10 centimètres cubes sur l'extrait-éther. On agite avec un petit agitateur, de manière à bien détacher le produit des parois du verre. Le liquide est extrêmement trouble. Il l'est encore au bout d'une heure. Nous le laissons reposer jusqu'à limpidité parfaite, puis nous filtrons avec le filtre Kumagawa et Suto. Le filtrat est limpide et paraît incolore.

Pour obtenir un liquide tout à fait incolore, divers essais préalables nous ont appris, après d'autres auteurs, qu'il était nécessaire d'avoir des extraits absolument secs, exempts

de toute trace d'eau, d'alcool ou d'éther. Dans le cas particulier, nous ne saurions affirmer qu'il en était ainsi, puisque par concentration spontanée à l'air libre une très légère coloration jaunâtre envahit la liqueur, laquelle néanmoins continue à demeurer limpide.

Tout le pétrole ayant disparu, le cristallisoir recèle une substance très légèrement colorée en jaune, d'aspect cireux, fusible à moins de 50°. On l'assèche à cette température pendant 4 heures, puis d'heure en heure jusqu'à poids constant dont la valeur est trouvée égale à 0 gr. 0873.

Bien entendu, à l'inverse de la solution pétrolique presque incolore, la matière laissée par le pétrole et bien lavée par lui jusqu'à ce qu'une goutte évaporée ne donne plus rien sur un verre de montre, est de couleur foncée, brune, soluble dans l'éther absolu. Nous y reviendrons dans les expériences suivantes.

Nous étudierons également d'une manière plus approfondie *l'extrait-éther de pétrole*, dont nous venons d'évaluer le poids. Nous pouvons prévoir qu'il représente toutefois les acides lipoïques presque purs, sans pouvoir affirmer immédiatement qu'il totalise les acides lipoïques tout entiers du sérum sanguin traité. Nous verrons, en effet, que l'insaponifiable en a retenu de petites quantités. Quant à la pureté de ces acides, en attendant mieux, nous la présumons en nous appuyant principalement sur la reprise à l'éther de pétrole, Kumagawa et Suto ayant montré que c'était là le meilleur mode de purification. Nous reviendrons sur ce sujet.

Sur la portion aqueuse nitrique d'où l'on a extrait les acides gras. — Cette portion mériterait à son tour d'être examinée. *A priori*, il ne semble pas qu'elle contienne aucune substance liposique de par sa réaction acide et si l'on considère la série des opérations d'où elle provient. Nous verrons plus tard ce qu'il faut penser de cette manière de voir.

V. — Traitement de la solution-alcool résultant du lavage du précipité argentique.

Ce filtrat contient évidemment l'insaponifiable en tout ou en partie, un excès de nitrate d'argent, un azotate alcalin et

sans doute quelques impuretés, parmi lesquelles il sera nécessaire d'examiner s'il n'y figure pas de petites quantités d'acides lipoïques, exceptées de la réaction argentique.

Pour se débarrasser de l'argent, nous le précipitons avec la potasse alcoolique à 1 pour 100 jusqu'à léger excès de cette dernière, notifié par le virage d'un papier de tournesol. L'oxyde d'argent se précipite avec une couleur brune. La filtration doit s'effectuer sans attendre et par décantation. Cette nécessité est encore plus impérieuse pour l'oxyde d'argent qu'en ce qui concerne les savons d'argent à l'égard desquels, nous l'avons vu, il faut également filtrer de suite. Le passage sur papier, moyennant cette précaution, est rapide et facile. Tout l'argent reste sur le filtre. Divers essais nous ont montré, au contraire, combien la séparation est rendue pénible après une attente de quelque durée. En pareil cas, on peut passer outre en distillant l'alcool en présence de l'oxyde d'argent non retenu par le filtre, mais quelques inconvénients se présentent alors. L'oxyde est réduit à l'état d'argent noir extrêmement fin et léger. Vers la fin de la distillation on l'aperçoit en lames brillantes à la surface du liquide. Rien ne dit, en outre, qu'il n'intervient pas pour donner lieu à des oxydations, soit du côté des acides résiduels, soit du côté de l'alcool.

Autre inconvénient : quand on reprend par l'eau la petite quantité d'alcool soustraite à la distillation, comme nous l'avons effectué, par exemple, dans des expériences d'essai, l'argent réduit, au lieu de tomber au fond de l'eau, se répand dans l'éther ajouté pour dissoudre l'insaponifiable et ce n'est qu'après 12 heures de repos qu'on le trouve à la partie inférieure de l'éther, mais non dans l'eau.

Au contraire, en respectant les quelques précautions prescrites après l'action de la potasse et filtration, on obtient un filtrat limpide, incolore, que l'on soumet sans inconvénient à la distillation pour récupérer la plus grande partie de l'alcool. On en conserve environ 20 centimètres cubes dans le ballon de distillation. Le liquide s'est troublé considérablement par l'effet notamment de la précipitation du nitrate de potasse. La liqueur est alcaline, cette alcalinité ne peut que protéger la cholestérine contre toute atteinte d'éthérification et, d'autre part, neutralisant les acides résiduels possibles, on

peut espérer qu'elle préviendra ultérieurement leur mélange avec l'insaponifiable.

Nous avons plusieurs fois constaté qu'en évaporant trop complètement l'alcool, reprenant par l'eau et par l'éther, celui-ci était parfois dans l'impossibilité de détruire le trouble de la liqueur aqueuse.

Dans ce cas, nous le verrons, l'éther n'a pas repris tout l'insaponifiable. Une quantité notable demeure dans la liqueur aqueuse à l'état d'émulsion. Ces phénomènes ont été déjà observés. Iscovesco (110), en particulier, a insisté sur la facilité avec laquelle la cholestérine était retenue par les savons d'alcali dans la solution aqueuse, malgré des lavages réitérés à l'éther. D'autre part, Grigaut (111) a montré qu'en présence d'alcool à 50° il parvenait à extraire la cholestérine totale du sérum sanguin. Nous inspirant de ces observations, après avoir évité l'évaporation complète de l'alcool du filtrat considéré tout à l'heure, nous y ajoutons un volume d'eau égal. Ceci entraîne un trouble encore plus considérable dont la formation spéciale s'explique, semble-t-il, par l'apparition de l'insaponifiable. Mais dès l'instant où interviennent deux volumes d'éther à 65° (Codex 1908) toutes les liqueurs s'éclaircissent après agitation suffisante et dès lors, grâce à l'ampoule à séparation, nous pouvons isoler d'un côté et de l'autre la portion éthérée et la portion aqueuse.

Dans quelques essais antérieurs, nous avons pu toutefois constater l'insuffisance de l'éther à détruire complètement l'émulsion éthylo-aqueuse à laquelle nous venons de faire allusion. Ce phénomène s'explique sans doute par la composition du milieu. Nous ne nous sommes pas attachés à en déterminer les facteurs. Au reste, nous adopterons ultérieurement un *modus operandi*, qui n'a pas à en tenir compte. Nous verrons aussi qu'en neutralisant et acidifiant la solution éthylo-aqueuse, toute émulsion devient impossible, mais alors on perd le bénéfice de la captation des acides gras résiduels, quand ils existent.

La solution éther, lavée comme nous savons le faire, puis évaporée, est séchée jusqu'à poids constant à 100°. On a un produit dont le poids est 0 gr. 0486. Il est blanc, cristallisé

(110) *Loc. cit.* p. 93.
(111) *Loc. cit.* p. 76.

en aiguilles rayonnant autour d'un centre (forme de houppes). C'est là la cristallisation ordinaire de la cholestérine née d'un solvant comme l'éther ou l'éther de pétrole. Repris par l'éther anhydre son poids devient : 0,0477.

Dans cette expérience, nous n'avons pas tenté de reprendre par l'éther de pétrole. La blancheur de la substance, sa cristallisation homogène et son type de cristallation, enfin son point de fusion nous permettent de penser qu'il s'agit bien de cholestérine. Ces suppositions acquièrent la force de la certitude quand on compare ce produit et son poids au produit pesé obtenu par la méthode de Grigaut sur le même sérum, comme nous le verrons plus loin.

Traitement de la portion aqueuse résultant de l'opération précédente. — Nous aurions pu la soumettre à un excès d'un acide minéral dilué et l'épuiser à nouveau par l'éther. De cette manière, ce dernier aurait dissous l'insaponifiable et les acides résiduels, que nous supposons encore exister dans cette solution aqueuse. En vue de séparer ces deux séries de corps, nous préférons tout simplement évaporer à sec la totalité de la liqueur aqueuse et l'assécher à 100°, jusqu'à poids constant. L'extrait obtenu est repris par un peu d'alcool sodique pour chasser les dernières traces d'eau, séché à nouveau à 100° et repris par l'éther de pétrole. Celui-ci abandonne un très faible résidu pesant 0 gr. 0003 pour lequel la réation de Liebermann étant positive, nous le tiendrons pour être de la cholestérine et bien qu'en somme il soit pratiquement négligeable, nous l'ajouterons à l'insaponifiable déjà acquis, soit :

$0{,}0480 + 0{,}0003 = 0{,}0483$ pour 30 centimètres cubes de sérum, ou 1,60 p. 1000.

Traitement du résidu abandonné par le pétrole dans l'opération précédente. — Ce résidu, soluble dans l'eau, est repris par un peu HCl dilué (on peut constater un louchissement évident) et lavé par l'éther dont l'évaporation donne lieu à un très léger enduit à la surface du cristallisoir où l'on opère. Cet enduit est fusible avant 50° et il pèse 0 gr.0006. Le pétrole le dissout complètement. Nous le tiendrons ici, sans autre examen, pour être constitué par des acides gras.

On pourrait, en pratique, au besoin les négliger. Nous n'en ferons rien et les ajouterons donc aux acides gras déjà trouvés, dont le total sera alors de : 0,0873 + 0,0006 = 0,0879 représentant le total des acides lipoïques purs pour 30 centimètres cubes de sérum, soit 2,93 p. 1000. Titrés volumétriquement, comme nous avons appris à le faire, on trouve en acide stéarique 3,09 p. 1000.

Ces acides résiduels ne doivent pas autrement nous surprendre. Dans la méthode de Kumagawa et Suto, le mélange d'acides gras et d'insaponifiable, traité par l'alcool potassique, puis par l'éther de pétrole, fournit un extrait de pétrole principalement composé d'insaponifiable, mais où, toujours, se trouvent présentes de petites quantités d'acides gras non négligeables et dont Kumagawa et Suto sont obligés de tenir compte par un traitement secondaire de cet extrait. Nous voyons que dans l'expérience présente notre précipité argentique a laissé échapper seulement des traces d'acides qu'il sera habituellement inutile de récupérer.

VI. — Traitement de la portion aqueuse nitrique d'où l'on a séparé par l'éther les acides lipoïques et l'insaponifiable, après saponification du *premier extrait éther-absolu*. — Dosage de la lécithine.

Nous opérons suivant les modifications apportées par Villiers (112) et conseillées à nouveau par Grimbert et Laudat. Nous ajouterons simplement quelques précisions d'ordre essentiellement pratique qui nous ont fourni les meilleurs résultats quand on ne peut disposer de centrifugeuse. En possession de cet instrument, on doit naturellement lui accorder la préférence.

Nous notons nos observations ici, puisque dans l'expérience présente nous avons filtré le précipité phosphomolybdique sur papier, au lieu de le centrifuger. Donc :

1° Notre liqueur aqueuse nitrique est évaporée au bain-marie dans une capsule de porcelaine de 40 à 50 centimètres cubes, et le résidu est incinéré. L'incinération doit se poursuivre à la température la plus basse possible, en évitant de

(112) Villiers. *Comptes Rendus des Séances de l'Acad. des Sciences*, t. 116, 1893, p. 990.

chauffer le fond de la capsule, mais seulement les bords. La matière, facilement fusible, blanchit rapidement. On arrive à ce résultat si l'on a eu soin, avant l'évaporation, de neutraliser l'acide nitrique par le carbonate de potasse et d'ajouter ce dernier en léger excès. L'oxydation et la fusion ont lieu alors sous l'influence d'un flux blanc, composé de $NO^3 K^2$ et $CO^3 K^2$, dont la température de fusion n'entraîne pas une détérioration des capsules ou creusets de porcelaine.

2° Ayant repris les cendres ainsi obtenues par l'eau nitrique bouillante et ayant filtré et lavé sur un entonnoir à tige capillaire, reçu le filtrat dans un verre conique d'environ 200 centimètres cubes, on l'additionne d'à peu près cinq fois son volume de la liqueur de molybdate d'ammonium nitrique recommandée. On laisse reposer 2 heures ou plus, après quoi on porte à l'étuve 40° pendant 4 heures (Grimbert et Laudat).

3° On filtre alors directement sans agiter sur des filtres tarés sans pli et refroidis à l'eau glacée. On peut faire repasser la même eau à plusieurs reprises sur les filtres en les remplissant complètement, puis, sans agiter, on verse d'une façon continue, et sans arrêt, le contenu du verre à pied sur le filtre. La filtration est très rapide, surtout avec des entonnoirs à tige longue et fine.

Le résidu resté dans le verre conique est quelquefois fort adhérent à la surface du verre. On le détache en le frottant légèrement au moyen d'un agitateur coiffé d'un caoutchouc et en présence d'un peu de liqueur-mère restée dans le verre. On filtre alors de manière à faire tomber tout le précipité sur le filtre. Si l'on n'y réussit pas du premier coup, ce qui est le cas général, on replace la liqueur-mère qui a filtré dans le même verre. On recommence jusqu'à ce que tout le précipité soit tombé dans le filtre. Ce dernier est lavé, ainsi que le verre et l'agitateur, avec la même liqueur-mère filtrée et limpide, mais étendue d'eau glacée, ou encore avec la liqueur molybdique primitive également étendue d'eau glacée.

Il est tout à fait important de recevoir ces filtrats de lavage dans des petits verres coniques d'une capacité égale à celle du filtre. Cette précaution indispensable a pour but de prévenir le cas où la liqueur passerait trouble. On la fait alors retomber sur le filtre et l'on ne se trouve pas ainsi exposé à diluer un léger louche dans une grande quantité de filtrat.

D'ailleurs, chaque fois, on doit recueillir à part, une certaine quantité de liqueur de lavage limpide. On l'additionne d'eau glacée pour abaisser graduellement son titre, jusqu'à ce qu'elle ne soit plus à la fin que de l'eau pure. Ceci est généralement une garantie contre le passage du précipité à travers le filtre, d'autant plus à craindre que la liqueur de lavage s'approche davantage de l'eau pure. On n'aurait plus alors, si cela survenait, qu'à repasser le filtrat sur le filtre jusqu'à limpidité, d'où l'importance de l'emploi des petits verres dont nous avons parlé plus haut.

Trois lavages à l'eau distillée glacée suffisent, quand on a bien opéré, pour obtenir un filtrat ne donnant plus de réaction acide au tournesol. On recueille les filtres en les saisissant au moyen d'une pince, on les place sur des petits entonnoirs et on les met à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. Ces diverses manœuvres, bien faites, n'exigent pas plus d'une heure à une heure et demie.

Remarque. — Quand, après un frottement suffisant qui ne doit pas aller jusqu'à entamer le caoutchouc, on ne réussit pas à détacher les dernières traces, adhérentes au verre, du précipité molybdique, nous conseillons l'artifice suivant :

Ayant égoutté le verre mais le laissant humide, on le saupoudre d'une quantité aussi faible que possible de SO^4Na^2 en poudre et au moyen du caoutchouc on frotte légèrement les régions d'adhérence avec cette poudre humide. Il suffit ensuite de laver avec la liqueur-mère et de continuer en se conformant aux indications plus haut détaillées.

Nous trouvons ainsi pour notre expérience n° 1 : 0 gr. 0819 comme poids du phospho-molybdate d'ammonium. La lécithine distéaro-cholinique correspondante pèse donc :

$\frac{0,0819}{2,3} = 0$ gr. 0355 pour un volume de 30 centimètres cubes de sérum, soit pour 1000 : 1,18.

VII. — Traitement du précipité protéique provenant de l'action de l'acétone sur le sérum.

Nous avons soumis ce précipité à la saponification directe, conformément à la technique de Grigaut (113), en vue d'y

(113) *Loc. cit.* p. 84.

rechercher la cholestérine résiduelle. Nous aurions pu aussi en profiter pour y rechercher et évaluer les acides lipoïques résiduels, mais nous ne l'avons pas fait, nous référant sur ce point aux expériences de Kumagawa-Suto-Shimidzu d'après lesquelles ces résidus sont parfaitement négligeables après épuisement par l'alcool. Nous trouvons pour la cholestérine un poids de 0,0001, soit pour 1000 : 0,003. Ce résidu est d'ailleurs bien, au moins partiellement, de la cholestérine, comme le montre la réaction de Liebermann.

Soumise à la même recherche, la portion aqueuse résultant de l'épuisement à l'éther du *résidu acétone-alcool-éther* nous fournit un maximum de cholestérine résiduelle de 0,0002, encore tout à fait négligeable.

RÉSUMÉ : L'expérience n° 1 se résume de la manière suivante :

	Sur 30cc	0/00	
1° Extrait aqueux-acétone terminé dans le vide pour éliminer l'acétone mais non l'eau. — Solution aqueuse. Extrait de pétrole correspondant	0,0002		
1° Extrait aqueux-acétone terminé dans le vide pour éliminer l'acétone mais non l'eau. — Solution éther.			
2° Extrait-alcool. Solution éther.			
3° Extrait-éther-aqueux total.			
4° Extrait-éther-absolu-total	0,1528	5,09	
5° Saponification alcoolique. — Solution aqueuse nitrique phosphomolybdate : 0,0796,			
5° Saponification alcoolique. — Lécithine	0,0355	1,18	
5° Saponification alcoolique. — Solution éther.			
6° Extrait-éther-aqueux acide	0,1372	4,57	
7° Solution alcool (interventions successives de KOH et CO^2).			
8° Précipité argentique. — Solution aqueuse nitrique.			
8° Précipité argentique. — Solution éther.			
9° Extrait-éther-aqueux acide.			
10° Extrait-éther de pétrole acide	0,0873		
11° Filtrat-alcool évaporé en partie. — Solution aqueuse — Extrait pétr. basique	0,0006		
	0,0879	2,93	(acidimétrie en acide stéarique : 3,09)
11° Filtrat-alcool évaporé en partie. — Solution aqueuse — Extrait pétr. acide	0,0003		
11° Filtrat-alcool évaporé en partie. — Solution éther.			
12° Extrait-éther-absolu-insaponifiable (extrait pétrole non fait)	0,0477		
	0,0480	1,60	

13° Extrait-pétrole provenant du traitement du résidu protéique épuisé (saponification directe de Grigaut) 0,0001

Les nombres représentant les acides lipoïques, la cholestérine et la lécithine dosés sont désignés par des encadrements rectangulaires.

Cette expérience montre que :

1° L'extraction des liposes a été complète;

2° L'insaponifiable obtenu est pur. Son dosage doit être exact, car on ne le retrouve qu'à l'état de traces dans les divers morcellements de sérum total traité.

3° Les acides lipoïques totaux doivent être aussi extraits complètement pour les mêmes motifs, mais cette seule expérience est insuffisante pour affirmer leur pureté, ou qu'une portion n'a pas été altérée au cours des manipulations.

4° La lécithine doit être dosée en totalité puisqu'elle dépend des acides lipoïques, eux-mêmes, extraits complètement.

Dans la suite, nous nous assurerons, au surplus, qu'on n'a laissé en arrière aucune trace de phosphore organique au moment du dosage de la lécithine.

EXPÉRIENCE 2

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

Comme nous l'avons spécifié au début de la description de l'expérience 1, à 30 centimètres cubes de sérum, nous avons ajouté 0 gr. 06 de cholestérine pure, soit 2 p. 1000. Ce sérum a été traité parallèlement à celui du n° 1 dépourvu de toute adjonction. Nous allons rechercher s'il nous sera possible de retrouver une dose de cholestérine égale à la somme de la cholestérine totale naturelle du sérum et de la cholestérine artificiellement introduite. Cette expérience ne saurait avoir qu'une valeur relative, la seconde fraction de cholestérine ne pouvant être comparée à la première, fixée au sein du sérum sous des formes évidemment différentes et dont la nature est encore dans la plupart des cas hypothétique.

De plus, considérée comme contrôle, elle ne saurait strictement intéresser que la cholestérine.

Au surplus, la cholestérine d'addition ne paraît pas appréciablement se dissoudre directement dans le sérum. Nous avons dû dissoudre la prise d'essai de cholestérine dans une petite quantité d'acétone, prélevée sur les 300 centimètres cubes où va s'effectuer la précipitation du sérum. Après avoir réuni à nouveau les deux fractions acétoniques, nous y précipitons le sérum et opérons sur lui comme il a été décrit à propos de l'expérience n° 1. Nous noterons donc simplement ici les particularités observées :

1° Quand une partie de l'acétone a été éliminée par distillation, on peut constater, flottant au sein du liquide, des substances blanches paraissant plus ou moins cristallisées.

2° Le *résidu-alcoolique* dérivant de l'épuisement du précipité protéique offre identiquement l'apparence, y compris les gouttelettes liquides au fond, du résidu correspondant de l'expérience n° 1.

3° En revanche, le *résidu-aqueux-acétonique*, au lieu d'être simplement lactescent, — sorte d'émulsion ou de liqueur tenant en suspension des matières solides excessivement fines — présente un précipité abondant, blanc, dû sans doute à la cholestérine ajoutée, à laquelle d'ailleurs il ressemble.

4° *L'extrait-éther 65*e est une matière grasse, d'un jaune un peu brun, liquide à chaud, sur quoi l'éther anhydre abandonne un résidu solide hétérogène, un peu noirâtre et d'ailleurs peu abondant.

5° *L'extrait-éther-absolu* est constitué par de nombreuses taches blanches affectant la forme de houppes (cholestérine). Son poids est de 0 gr. 2228.

6° Après saponification et mise en liberté des acides gras au moyen d'acide nitrique, on est conduit à l'*extrait-éther-absolu acide* dont le poids est de 0 gr. 1994.

7° La liqueur nitrique, traitée comme il a été exposé afin d'en évaluer le phosphore et la lécithine correspondante, donne 0 gr. 0794 de phosphomolybdate d'ammonium, soit :

$$\frac{0 \text{ gr. } 0794}{2,3} = 0 \text{ gr. } 0345$$

de distéaro-lécithine de choline pour 30 centimètres cubes, soit encore 1,15 p. 1000.

8° En raison de la forte proportion de cholestérine prévue, le précipité argentique, au lieu d'être lavé à l'alcool — précédant le passage d'une petite quantité d'éther absolu — est uniquement lavé au moyen de l'éther, celui-ci ayant un pouvoir solvant beaucoup plus considérable pour la cholestérine. Le précipité est noyé dans l'éther, ce qui exige chaque fois 5 à 6 centimètres cubes, puis bien malaxé au moyen d'un petit agitateur. L'éther, malgré son action solvante sur les pigments, traverse le filtre parfaitement incolore.

9° Le filtrat alcool séparé du précipité argentique, soumis aux manipulations exécutées conformément à la technique de l'expérience n° 1, donne un extrait éthéré qui est repris par la *solution-éther-absolu* précédente. Après filtration, la nouvelle solution, évaporée, laisse un poids total de 0 gr. 1108. Reprise par un peu d'alcool sodique et par l'éther de pétrole, après séchage à 100°, on obtient un poids de 0 gr. 1058, soit pour 1000 : 3,52.

Si l'on en extrait la quantité d'insaponifiable trouvée dans l'expérience n° 1, on déduit 1,92 p. 1000, soit sensiblement le poids de la cholestérine artificiellement ajoutée, qui était de 2 p. 1000.

Dans cette expérience n° 2, nous n'avons pas traité les savons d'argent.

Le précipité protéique nous conduit à une cholestérine résiduelle dont le poids maximum égale 0,0002 et dont la nature est démontrée par la réaction de Liebermann. La liqueur aqueuse correspondant à la même, examinée dans l'expérience n° 1, nous permet d'évaluer ici une cholestérine résiduelle égale à 0,0003, également positive à la réaction de Liebermann. Tous ces résidus sont évidemment négligeables, puisque leur somme n'arrive pas à faire le milligramme qui n'entraînerait qu'une erreur par défaut de 0,03, négligeable elle-même.

Quant aux liqueurs aqueuses nitriques, c'est tout au plus si elles retiendraient des résidus analogues, leur nature acide nous garantissant contre des pertes plus importantes.

Comme pour l'expérience n° 1, l'extraction des liposes du sérum a donc été au même degré pratiquement complète.

EXPÉRIENCE 3

MÉTHODE PONDÉRALE DE GRIGAUT

La précision de notre méthode aurait pu se déduire de l'expérience 1 seule, puisqu'en appliquant des procédés éprouvés sur tous les résidus laissés de côté par l'application même de notre méthode, nous n'avons trouvé dans ces résidus que des quantités négligeables de cholestérine, d'acides lipoïques et par conséquent de lécithine. A la vérité, cette expérience montre l'exactitude de notre méthode quant à la suffisance des pouvoirs extractifs mis en œuvre. Mais si chaque lipose est bien extraite en totalité, nous ne sommes pas absolument renseignés sur leur altération possible au cours des manipulations qu'elles ont subies. L'expérience 2 elle-même ne présente pas un avantage notable à ce point de vue. En effet, l'application des mêmes manœuvres doit conduire logiquement à l'obtention des mêmes quantités de substances naturelles dosées. L'expérience 2 prouve seulement que l'extraction des liposes a été très probablement complète, que la cholestérine artificiellement ajoutée, retrouvée intégralement, a bien été extraite en totalité, inaltérée et sans pertes, mais elle ne prouve pas qu'il n'y a pas eu de pertes subies du fait d'une altération de la cholestérine naturelle.

L'expérience actuelle, au contraire, va nous permettre de conclure, non seulement à l'extraction complète de la cholestérine naturelle, mais encore à son dosage à l'état de pureté, ce dosage portant d'ailleurs sur l'intégralité de cette substance, qui n'a donc pas subi de pertes ou d'altérations au cours des opérations. Pour être assuré d'un tel contrôle, il faut varier les procédés d'extraction et les comparer; s'adresser par conséquent à une méthode de comparaison éprouvée quant à son exactitude. Dans ce but, nous avons employé la méthode Grigaut, dont la rigueur ne fait aucun doute pour personne. Elle concerne, il est vrai, la cholestérine seule. Nous établirons plus tard des comparaisons avec des procédés plus généraux.

Au début de l'expérience 1, nous avons prélevé 30 centimètres cubes de sérum pour les soumettre à l'épreuve Grigaut. Après autoclavation à 120° pendant une heure, en pré-

sence de lessive de soude, on trouve une liqueur trouble et brune, présentant une vague odeur ammoniacale et savonneuse. L'éther d'épuisement ne se colore pas. On trouve 0 gr. 0494 de cholestérine, soit 1,646 p. 1.000, chiffre en accord avec ceux trouvés dans les expériences 1 et 2.

Par conséquent, notre méthode permet l'extraction de la cholestérine totale du sérum de cheval à l'état de pureté, sans entraîner aucune altération de ce composé au cours de la succession des manœuvres constituant notre méthode.

EXPÉRIENCE 4

MÉTHODE DE SAPONIFICATION DIRECTE GRIGAUT MODIFIÉE

Cette expérience n'offre pas un intérêt immédiat vis-à-vis de la question qui nous occupe ici. Nous la mentionnons toutefois à titre de curiosité et parce qu'elle vient à l'appui d'observations faites par divers savants.

La portion aqueuse de l'expérience 3, issue de l'épuisement par l'éther, acidifiée au moyen d'acide chlorhydrique, est le siège d'un dégagement abondant d'anhydride carbonique. En même temps, la liqueur s'éclaircit, des matières solides y prennent naissance et nagent au milieu d'elle.

Si l'on fait intervenir l'éther sur cette liqueur acide, le solvant se colore assez vivement en jaune brun. Il s'empare donc de substances qu'il n'avait pas saisies dans la liqueur alcaline.

Quand nous avons commencé l'expérience 1, nous avons prélevé une quatrième portion de sérum d'un volume égal à 30 centimètres cubes. Il a été autoclavé suivant Grigaut, puis soumis à l'action de HCl jusqu'à acidité, porté à l'ébullition, refroidi vers 30° et épuisé par l'éther. Ce dernier, lavé à l'eau, reste acide au tournesol. C'est en somme l'application du procédé de saponification directe de Kumagawa et Suto au sérum, sauf l'intervention de l'autoclave introduite par Grigaut.

2 centimètres cubes d'une solution alcoolique de NaOH à 1 p. 100, ajoutés à l'éther, y déterminent un trouble qui disparaît par un lavage à l'eau. La solution éthérée subit ensuite

les manœuvres de la méthode Grigaut, lesquelles conduisent à 0 gr. 0413 de cholestérine, soit 1 gr. 376 p. 1000.

On peut constater une perte de 16,16 pour 100 sur la cholestérine totale déterminée plus haut. Elle ne saurait nous surprendre pour différentes raisons. En premier lieu, la démonstration faite par Shimidzu de l'inexactitude de la méthode de saponification directe appliquée au sérum. On peut invoquer, en outre, peut-être, l'entraînement d'une minime quantité de cholestérine à la faveur de la formation des savons alcalins quand on a neutralisé par la soude. Cet entraînement a été reconnu, comme nous ne l'ignorons pas, par différents auteurs, entre autres Iscovesco.

Tableau résumé des Expériences 1, 2, 3 et 4 du 1er groupe.

SÉRUM 30 CC.	MÉTHODE DE TRAITEMENT	LÉCITHINE	LÉCITHINE °/oo	INSAPONIFIABLE (CHOLESTÉRINE)	CHOLESTÉRINE °/oo	ACIDES LIPOÏQUES TOTAUX	ACIDES LIPOÏQUES °/oo	ACIDIMÉTRIE EN ACIDE STÉARIQUE
1	Acétone-Savons d'argent.	0,0355	1,18	0,0480	1,60	0,0879	2,93	3,09
2 *	Acétone-Savons d'argent.	0,0345	1,15	0,1058	3,52 (**)	»	»	»
3	Saponification directe (Grigaut	»	»	0,0494	1,64	»	»	»
4	Saponification directe (Kumagawa-Suto-Grigaut) (***) .	»	»	0,0413	1,37	»	»	»

Ce tableau montre un accord aussi satisfaisant que possible des nombres similaires. La conclusion est la suivante : La méthode acétone-savons d'argent est rigoureuse pour l'insaponifiable. Tout fait présumer qu'il en est de même touchant

(*) Ce sérum n° 2 a été enrichi de 0,060 de cholestérine, soit de 2 p. 1000.
(**) On en retrouve 3,52 — 1,60 = 1,92 p. 1000.
(***) Nous avons expliqué comment ce traitement ne pouvait être exact.

la lécithine et les acides lipoïques totaux. La certitude de leur extraction complète est évidente, mais il n'en ressort pas indubitablement qu'ils soient obtenus sans altérations ou impuretés, du moins en ce qui concerne les acides lipoïques.

Deuxième groupe d'expériences.

EXPÉRIENCE I

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction.

1° Extraction acétonique. — Prise d'essai : 40 centimètres cubes précipités dans 1200 centimètres cubes de sérum. Distillation de l'acétone au bain-marie, puis dans le vide jusqu'à distillation d'un peu d'eau, d'ailleurs neutre au tournesol. Cette liqueur aqueuse est épuisée à l'éther. Ici, sans que nous puissions en déterminer exactement la cause, la portion aqueuse restante demeure louche. Avec le temps, ce louche monte à la surface. Le lendemain on trouve une liqueur limpide, un peu jaune d'ambre, couleur analogue à celle de l'alcool d'épuisement, succédant à l'acétone, sur le précipité protéique. Au milieu de cette liqueur aqueuse flotte une couronne hétérogène. Examinée à la loupe, on y distingue une partie granuleuse enrobant des portions noirâtres. Tout autour se trouvent concentrés des globules d'apparence grasse, analogues aux globules du lait vus au microscope. L'éther paraît ici avoir été impuissant à recueillir toute la matière grasse. Cette liqueur est neutre au tournesol.

La solution acétonique était d'un beau jaune d'or. L'éther de lavage s'est emparé de la même couleur, mais, comme nous l'avons vu, la liqueur aqueuse restante présente une teinte ambrée. Faut-il en inférer qu'il s'agit d'un fractionnement de pigments sanguins différents les uns des autres ou d'une dissociation d'un ou de plusieurs des pigments? Nous ne traiterons pas ici cette question, nous bornant à rappeler un peu plus loin les quelques essais que nous avons tentés dans cette direction.

Traitement de la portion aqueuse acétonique. Sur la nature des

substances dissoutes par l'acétone. — Evaporée au bain-marie à basse température, la liqueur aqueuse laisse un résidu jaunâtre au milieu duquel on peut discerner une petite région noirâtre. Séché à 50° et repris par l'alcool bouillant, celui-ci filtré passe avec une coloration jaune d'or et abandonne une matière d'apparence sableuse encore un peu jaunâtre.

Evaporé au bain-marie, cet alcool laisse de petits cristaux colorés en jaune. Après étuvation à 50° et lavage à l'éther anhydre, on obtient comme résidu une sorte de sable, qui, sur la lame de platine, charbonne, puis donne une cendre fusible, présentant les caractères de NaCl. L'éther, filtré sur amiante et coton, aboutit à un extrait d'apparence cireuse, jaunâtre (particules blanches noyées dans un milieu d'aspect cireux) que nous appellerons *extrait-éther-acétone n° 2*, dont le poids est 0 gr. 0440.

Une partie du résidu sablonneux provenant de cet éther, soumise à l'action de l'hypobromite de soude, dégage abondamment un gaz n'entretenant pas la combustion et qu'on peut considérer comme étant de l'azote. Il provient sans doute d'urée dissoute par l'alcool avec un peu de chlorure de sodium. Les petits cristaux mentionnés plus haut étaient, faut-il le croire, formés de cette urée.

Nous avons vu que l'extrait aqueux desséché, épuisé par l'alcool bouillant, est réduit à une matière sableuse encore un peu jaunâtre. Essayons de déterminer la nature de cette matière, comme nous l'avons fait pour la seconde, résultant du traitement à l'éther.

Sur la lame de platine, elle charbonne à peine, ne brûle pas et finit par fondre quand la lame est portée au rouge. NO^3Ag fournit un abondant précipité insoluble dans NO^3H. Il s'agit donc, comme précédemment, de chlorure de sodium.

Si l'on reprend par l'eau, à froid, la totalité de la matière non soumise à cet essai, elle est presque entièrement soluble. A cette solution on ajoute un volume double de sulfate d'ammoniaque saturé à froid. On n'obtient rien, même à l'ébullition. Il n'y a donc pas de protéines.

Si l'on admet que l'anneau flotteur décrit dans la portion aqueuse, après son traitement par l'éther, est constitué en partie par des substances albuminoïdes, étant donnée la légèreté de cet anneau — d'ailleurs formé aussi de matières

grasses, comme nous l'avons constaté — on peut en induire à une quantité très faible d'albuminoïdes. En définitive, nous sommes amené à conclure que l'acétone a soustrait au sérum un peu de protéines, probablement à la faveur de l'eau entraînée, mais en réalité une quantité très faible, à moins d'admettre qu'une autre portion n'ait été, en même temps, dédoublée sous des formes inconnues.

En somme, l'acétone, à l'instar de l'alcool, quand on y précipite le sérum, entraîne comme lui du chlorure de sodium, de l'urée, de minimes quantités de protéines, d'autres substances azotées composant probablement celles d'où l'on évalue l'azote résiduel dans l'azothémométrie et, naturellement, les liposes, les lipochromes et enfin la bilirubine, d'après les constatations que nous ferons bientôt. Cette dernière est, en effet, dissoute principalement par l'éther d'épuisement de la portion aqueuse dont nous venons d'esquisser l'étude.

Traitement de la solution-éther d'épuisement de la portion aqueuse acétonique. — Comme nous le savons, la solution acétonique est jaune d'or. Cette coloration passe dans l'éther d'épuisement de la portion aqueuse provenant de l'évaporation de l'acétone. Quand on distille l'éther, une petite quantité d'une poussière ocreuse se met à flotter dans le liquide. Peut-on admettre que l'éther, et par conséquent l'acétone, doivent leur vive coloration à la bilirubine du sérum, bilirubine qui s'isolerait en partie sous la forme ocreuse dont nous venons de parler, au cours de sa concentration dans l'éther?

Essayons de traiter la question par comparaison avec de la bilirubine pure (marque Merck).

Constatons d'abord que cette substance est soluble dans l'acétone en y déterminant une coloration jaune d'or, point commun avec notre solution acétonique d'origine sanguine.

Si, à cette solution acétonique, on mélange environ le double d'eau et volume égal d'éther, après agitation énergique on parvient à faire passer la bilirubine dans l'éther. Celui-ci se colore en jaune d'or; en même temps l'eau est décolorée.

D'autre part, prenons du sérum. Précipitons-le dans l'acétone. Après filtration, ajoutons-y assez d'eau, à peu près le double, pour arriver à constater un commencement de trouble,

puis volume égal d'éther. Après agitation énergique, toute la couleur est passée dans l'éther et celui-ci a vu son volume augmenter de plus d'un tiers. L'éther a donc enlevé non seulement les liposes et les pigments, mais encore une partie au moins de l'acétone. Quant à l'eau, elle est limpide.

Si maintenant on ajoute l'éther directement, à égal volume, à une autre portion de la solution acétonique, sans addition d'eau, on peut constater deux couches : la supérieure très colorée et très augmentée de volume, à cause de l'acétone enlevée; l'inférieure, aqueuse et cependant demeurant un peu colorée, cela sans doute à cause de sa richesse en acétone, partagé entre l'éther et l'eau, acétone qui retient une partie des substances solubles dans l'éther.

Par conséquent, il suit de cette double épreuve, qu'il y aurait intérêt à évaporer l'acétone jusqu'à commencement de trouble, mais sans aller au-delà. Cette dernière constatation, faite en passant, n'a qu'un intérêt secondaire au point de vue du dosage des liposes. Nous verrons qu'on peut se dispenser de tenir compte et d'apprécier le moment le plus favorable à l'épuisement éthérique des liposes en évaporant tout simplement à sec, la liqueur acétonique.

Le fait précédent a le mérite cependant d'ajouter une autre analogie à celle de la coloration, en ce qui concerne l'identification du pigment sanguin colorant l'acétone en jaune d'or.

Nouvelle analogie : nous avons parlé d'une poussière ocreuse s'isolant de l'éther quand on distille celui-ci. Remarque identique a été faite quand nous avons distillé l'éther d'épuisement de l'eau acétonique, issue elle-même de la solution acétonique artificiellement préparée avec de la véritable bilirubine.

Quatrième analogie : Si, à la surface de NO^3H fumant, on fait tomber avec précaution une fraction de la solution acétonique provenant de la précipitation du sérum préparé tout à l'heure, de manière à éviter le mélange, on peut apercevoir, à la surface de séparation, un anneau vert fugace (réaction de Gmelin) bientôt remplacé par un anneau orangé, dont le niveau s'élève peu à peu par suite de l'affinité de l'acide pour l'acétone.

Cette expérience suffirait peut-être à elle seule à témoigner

de la présence de la bilirubine dans l'acétone et par conséquent dans le sérum.

Répétée avec de l'acétone pur du bisulfite, cette expérience non seulement ne donne lieu à aucun anneau ni coloration, mais l'acétone se mélange immédiatement à l'acide en le décolorant complètement. En même temps la liqueur s'échauffe et peut même arriver à détoner.

Si, pour se placer dans des conditions analogues à celles de l'acétone sanguine, on dilue d'un peu d'eau l'acétone bisulfitique, cet acétone devient immédiatement jaune orangé, sans présenter de coloration verte à aucun moment.

La même expérience, répétée à nouveau avec l'acétone ordinaire, simplement distillé, fournit les mêmes résultats.

Notons qu'il y aurait peut-être là un moyen de constater la pureté de l'acétone.

Pour en revenir à notre solution éther, elle fournit un extrait sec auquel nous donnons le nom *d'extrait-éther-acétone n° 1*, dont le poids est 0 gr. 1289. Il est formé de quelques cristaux blancs inclus dans une matière d'aspect cireux.

2° Extraction alcoolique. — Traitement de la solution-alcool provenant de l'épuisement du précipité protéo-acétonique. — La solution alcool, de couleur jaune ambrée, provenant de l'épuisement du résidu albuminoïde du sang, vers la fin de son évaporation, laisse déposer aussi quelques parcelles ocreuses, comme nous l'avons vu à propos de l'éther. On termine sous l'action du vide. L'évaporation s'effectue très bien à cause du départ de l'eau enlevée par l'acétone. Le résidu est hétérogène. L'éther anhydre intervenant ne se colore que peu (jaunâtre); les parties ocreuses n'y paraissent pas solubles; au contraire, l'alcool, même en petite quantité, les dissout bien (Quelle est cette substance ?). — Il y a aussi une sorte de sable blanc qui ne se dissout pas non plus.

Cet éther est filtré et on y joint l'éther de lavage provenant de l'évaporation de celui qui a lavé le résidu albuminoïde, qui avait emporté une forte proportion d'alcool et qui, par conséquent, pouvait avoir dissout les substances

déjà dissoutes par l'alcool, celui-ci n'ayant pas complètement épuisé le résidu albuminoïde.

Ces éthers de lavage filtrent clair sur coton.

Examen de la matière ocreuse. — La partie ocreuse restante, chauffée sur la lame de platine, se gonfle d'abord. Il reste une masse noirâtre dont le volume se concrète dans le feu d'oxydation, en laissant exsuder quelques gouttelettes d'un liquide incolore. Il reste en définitive une masse noire. Est-ce du charbon ou du fer? La partie fusible était évidemment NaCl qui, par conséquent, n'a pas été emporté entièrement par l'acétone.

Quant à la partie noirâtre, elle est bien formée de charbon enrobé par NaCl en fusion; on a réussi, en effet, à en faire brûler complètement une parcelle.

La matière ocreuse, d'aspect et toucher gras, est soluble dans l'alcool en le colorant en ambre, ce qui n'est pas bien surprenant puisqu'elle en provient. Elle est également soluble dans l'eau en lui communiquant la même couleur jaune ambré. Mais, en revanche, elle paraît parfaitement insensible à l'action de l'acétone pur, même à l'ébullition.

Ainsi ce pigment jaune brun, qui colore l'eau et l'alcool en jaune ambré, paraît vraiment différent du pigment dissous par l'acétone qu'il colore en jaune d'or, différent par conséquent aussi de la bilirubine, qui est soluble dans l'acétone.

Si aux solutions alcoolique et aqueuse de tout à l'heure on ajoute de l'acétone, on n'obtient pas de louche, mais cela ne signifie rien car on a opéré sur une quantité de matière très faible et nous savons d'ailleurs, que bien d'autres produits résistent aux effets précipitants d'un liquide quand ils sont préalablement dissous par un autre.

Ce pigment est également insoluble dans l'éther, comme on a déjà pu le constater, mais il est soluble dans $CHCl^3$ à froid. De cela on pourrait peut-être déduire — en ajoutant cette hypothèse aux autres déjà émises sur le même sujet, — que si l'acétone et l'éther sont incapables d'extraire toutes les lipoïnes et toute la cholestérine du sérum, c'est qu'une partie de celles-ci se trouveraient masquées par ce pigment.

A ce compte, il deviendrait inutile de laver le résidu albuminoïde acétonique par l'éther, après l'avoir épuisé par

l'alcool. C'est là, au surplus, un fait prouvé. Il se passe par conséquent d'hypothèse. Au reste, un lavage par l'éther, avant l'alcool, du précipité protéique acétonique, a donné de mauvais résultats dans une autre expérience, en conformité des résultats fournis sur ce point par Kumagawa et Suto.

Les caractères de solubilité du pigment dont il est question ici, l'écartent à la fois des lécithines solubles dans l'éther, insolubles dans l'eau, et des protéines insolubles dans $CHCl^3$ et dans l'alcool. Ils la différentient aussi, on l'a vu, de la bilirubine.

Y a-t-il du phosphore dans cette matière ocreuse? Sous l'influence du flux blanc dissous avec le pigment dans un peu d'eau, puis de la calcination, la matière noircit. On l'incinère, reprend par AzO^3H aqueux, traite par excès de molybdate d'ammoniaque. On n'obtient rien, même avec le temps. Donc pas de phosphore.

Y a-t-il de l'urée dans cette matière ocreuse? Sur une très petite quantité soluble dans quelques gouttes d'eau, on fait agir l'hypobromite de soude, mais on ne constate pas de dégagement gazeux appréciable.

Y a-t-il de l'azote dans cette matière ocreuse? Nous n'avons pu répondre à cette question faute de produit.

Ces quelques essais sont insuffisants pour tirer une conclusion formelle non seulement sur la nature de ce pigment, mais encore sur les relations de genèse positives qui peuvent l'unir à la bilirubine et même sur les relations négatives qui peuvent en faire un pigment indépendant de la bilirubine. Tout ceci cependant ne nous apparaît pas comme dénué absolument d'intérêt; c'est pourquoi nous avons cru devoir en faire mention.

Revenons maintenant à notre solution éthérée filtrée. Elle fournit un extrait-éther-alcool d'un poids égal à 0 gr. 0168, surtout formé d'aiguilles rayonnant autour d'un centre.

Le poids total des trois extraits éthérés obtenus jusqu'ici est :

Extrait acétone n° 1.	0 gr. 1289
Extrait acétone n° 2.	0 gr. 0440
Extrait éther alcool.	0 gr. 0168
	0 gr. 1897 (*)

II. — Saponification de l'extrait-éther total.

A l'aide d'éther ces extraits sont transvasés dans un ballon. L'éther évaporé, adjonction d'alcool et de 6 centimètres cubes NaOH à 1 p. 100. En réalité on pourrait se borner à 1 ou 2 centimètres cubes, mais il faut faire la part de la carbonatation (**). Bain-marie ascentionnel pendant 3 heures, évaporation, en dernier lieu dans le vide. Reprise par l'eau bouillante qui détermine un trouble assez sérieux (insaponifiable ou dissociation des savons). Adjonction de Az O^3H au 1/3. Les acides gras montent à la surface. Adjonction du double d'éther. Dans la partie aqueuse on remarque un réseau léger qui ne tarde pas à monter à la surface de séparation. Mais ce réseau, à la loupe, ne paraît pas formé de globules gras. Les deux parties sont légèrement colorées en ambre, mais surtout l'éthérée.

L'éther évaporé, le résidu sec est additionné d'alcool, 50 centimètres cubes environ, qui se colore en ambre comme toujours, puis de 3 centimètres cubes NaOH 1 p. 100, après laquelle survient, au bout de peu de temps, un léger louche que la chaleur parvient à peine à détruire (carbonatation partielle), ensuite courant CO^2.

III. — Précipité argentique. Formation des savons d'argent.

Pour obtenir le virage net d'une goutte de chromate, il a fallu 11 cent. cubes 8 de Az O^3 Ag alcoolique titré précédemment. Virage effectué avec la liqueur surnageant le précipité, ce qui est important pour ne pas avoir d'erreur.

(*) Le poids de la somme des deux extraits acétone, $0{,}1289 + 0{,}0440 = 0{,}1729$ est donc $\left(\frac{0{,}1729}{0{,}0168} = 10{,}29\right)$ plus de 10 fois supérieur à l'extrait éther-alcool. Il vaut les 91,14 o/o de l'extrait-éther-absolu. Kumagawa et Suto ont trouvé pour les tissus musculaires : 62 o/o. (Voir aussi p. 233.)

(**) La carbonatation des solutions alcooliques alcalines survient assez rapidement, surtout dans un flacon entamé. Il faut en vérifier le titre assez souvent quand on veut s'en servir comme liqueur titrée, ce qui n'est pas présentement le cas.

Du reste, la goutte de chromate doit devenir rose brusquement et uniformément quand c'est l'excès d'Az O^3Ag qui l'a influencée.

Le filtratum est détaché du filtre par des jets d'eau puissants; il flotte d'abord puis tombe au fond du vase en louchissant l'eau. Si l'on ajoute de l'éther et agite, c'est celui-ci qui louchit, l'eau devient limpide. L'éther est neutre au tournesol. Le savon d'agent reste en majeure partie au niveau de séparation des deux liquides. Après l'action de AzO^3H au 1/3, l'éther devient limpide mais reste marron même après agitation, dans l'ampoule à décantation, et après lavage à l'eau. Ne faut-il pas en conclure que le savon d'argent a entraîné les pigments dans sa formation ? Cependant la solution insaponifiable dans l'alcool est elle-même très légèrement ambrée. Faut-il alors croire à un partage du pigment ou à de l'argent retenu par l'éther sous une forme quelconque ?

On ajoute donc 4 centimètres cubes environ de Na OH alcoolique à 1 p. 100, ce qui représente plus du double de la quantité nécessaire calculée et cela pour tenir compte de l'excès et aussi de la carbonatation partielle de la liqueur.

Incinération du filtre provenant de la filtration de l'eau azotique qui a isolé les acides gras des savons d'argent. — Le poids des cendres est 0 gr. 0024. Après chauffage au rouge, même poids. Il s'agit d'argent métallique.

Acides gras isolés par NO^3H et provenant des savons d'argent. — Poids de l'extrait éthéré brut : 0 gr. 0759, soit 1,90 p. 1000. Cet extrait a une couleur brune prononcée. Il est solide à 50° et présente une odeur âcre.

Le pétrole ne dissout pas un résidu abondant, très pigmenté, soluble dans l'éther anhydre, insoluble dans l'eau, et d'une odeur âcre forte.

Le pétrole évaporé laisse un résidu d'aspect cireux, assez facilement fusible (solution à chaud d'acides gras dans l'acide oléique plus fusible), dont le poids est 0 gr. 0682, soit 1,70 p. 1000 et en acide stéarique 1,77 p. 1000, évalué volumétriquement en liqueur alcoolique, comme nous l'avons maintes fois expliqué.

Argent provenant de l'incinération du filtre ayant filtré la solution alcoolique d'insaponifiable après précipitation de l'argent au moyen de NaOH. — Cette précipitation, comme on sait, donne naissance à l'oxyde d'argent brun qui reste longtemps en suspension dans la liqueur. Pendant ce temps là il se réduit (cette réduction est bien due à l'alcool ou à ses impuretés (aldéhyde) comme le montre une expérience à part) à l'état d'argent métallique (si on ne filtre aussitôt), lequel arrive à se déposer complètement. La filtration de AgOH, quoique assez facile sur papier, devient excessivement rapide quand la réduction a été effectuée. Cette réduction est-elle un inconvénient pour la cholestérine? Non, puisqu'on obtient le chiffre de cholestérine obtenu par une autre méthode (Grigaut).

Poids d'argent obtenu : 0 g. 0266.

Le creuset étant porté au rouge, le poids ne change pas. Ce résidu est traité par NO^3H d'abord pur, ensuite aqueux. On évapore au bain-marie et on dissout dans l'eau. NO^3H laisse une faible partie noire inattaquée adhérente au creuset. Le dosage par voie humide donne 0 gr. 0219 d'argent.

IV. — Traitement de la solution alcool insaponifiable. Dosage de la cholestérine.

Le filtrat, isolé des savons d'argent, est additionné de Na OH alcool 1 p. 100 jusqu'à cessation du précipité. On s'en aperçoit en regardant le liquide obliquement. On filtre à nouveau. L'alcool est évaporé jusqu'à 15 centimètres cubes. Ce résidu est placé dans une éprouvette et on l'additionne d'eau jusqu'à 30 centimètres cubes. Il présentait un fort précipité de carbonate de soude. Quand on ajoute l'eau ce précipité se double d'un précipité considérable d'insaponifiable. On fait passer dans l'ampoule à robinet et on ajoute le double d'éther et aussi l'éther anhydre de lavage des savons d'argent qui avait été réservé. Aussitôt la liqueur s'éclaircit complètement. L'éther est très légèrement ambré. La liqueur aqueuse l'est plus fortement. Le 2e éther de lavage ne modifie pas cette coloration, tandis que lui-même reste incolore.

Toutefois, pour savoir si l'éther a enlevé complètement la cholestérine, on évapore la portion aqueuse, qui laisse un

résidu jaunâtre qu'on sèche à 100°, traite par l'éther de pétrole, ce qui laisse un second résidu également jaunâtre (coloration qui n'est pas soluble dans l'éther, soluble dans l'eau alcaline, ce qui est peut-être la raison pour laquelle sa couleur n'est pas soluble dans l'éther) tandis que l'éther de pétrole passe incolore et laisse lui-même un résidu. La réaction de Liebermann indique que ce résidu contient de la cholestérine, mais en quantité extrêmement faible, analogue à celle évaluée dans l'expérience 1 du 1er Groupe.

On trouve pour le poids extrait-éther 0 gr. 0472. Il présente une coloration très légèrement ambrée. Si on le reprend par l'éther anhydre, son filtrat en est très limpide mais présente toujours la coloration légèrement ambrée, tandis que le résidu non dissous reste blanc.

Cette dissolution du pigment peut entrer en comparaison avec celle du pigment des acides gras non dissous par l'éther de pétrole et qui, au contraire, est soluble dans l'éther anhydre. On peut se demander si ce n'est pas ce même pigment qui se distribue ainsi partout.

Le résidu blanc laissé par l'éther anhydre est entièrement soluble dans l'eau. C'est un sel minéral.

L'*insaponifiable éther absolu* a pour poids 0 gr. 0448, soit 1,12 p. 1000. Très légèrement coloré, il est bien cristallisé en houppes.

L'extrait éther absolu n'étant pas bien blanc dans tous les cas, il semble qu'il y ait intérêt à se priver de son concours et à faire emploi immédiat du pétrole.

Quoi qu'il en soit, l'extrait-éther absolu précédent, repris par le pétrole, donne 0,0435 d'insaponifiable cristallisé et blanc, soit 1,08 p. 1000.

V. — Traitement de la solution aqueuse nitrique issue de la saponification de l'extrait-éther absolu total. Dosage du phosphore organique.

Ce dosage est effectué conformément à la technique décrite p. 194. On obtient un poids de phosphomolybdate égal à 0,1120, d'où lécithine correspondante $\frac{0,1120}{2,3} = 0,048$ pour 40 centimètres cubes. Pour 1.000 = 1,20.

EXPÉRIENCE 2.

MÉTHODE PONDÉRALE DE GRIGAUT

Le procédé Grigaut pondéral, appliqué sur le même sérum, fournit un poids d'insaponifiable = à 0,90.

Tableau résumé des expériences 1 et 2 du 2e groupe

EXTRAITS DU SÉRUM	POUR 40 C.C.	POUR 1000	
Extrait éther acétone n° 1 (*)	0,1289	3,22	
— éther acétone n° 2 (**).	0,0440	1,10	
— acétone total.	0,1729	4,32	
— éther alcool	0,0168	0,42	
— éther absolu total.	0,1897	4,74	
Saponification et précipitation argentique :			
Extrait éther acide brut	0,0759	1,90	
— pétrole acide ou acides lipoïques totaux	0,0682	1,70	(acidimétrie en acide stéarique 1,77)
— éther d'insaponifiable.	0,0472	1,18	
— éther absolu d'insaponifiable. .	0,0448	1,12	
— pétrole d'insaponifiable	0,0435	1,08	(méthode pondérale de Grigaut 0,90
Phosphomolybdate d'ammonium . . .	0,1120	2.80	
Lécithine correspondante.	0,0480	1,20	

Nous n'avons contrôlé cette expérience qu'en ce qui concerne la cholestérine au moyen de la méthode Grigaut. La concordance de ces nombres nous permet de penser à l'exactitude des autres, surtout si l'on tient compte des expériences du premier groupe contrôlées par Grigaut et sur elles-mêmes.

Cependant, nous sommes encore obligé à des réserves concernant les acides lipoïques.

Remarquons qu'à l'exemple de Kumagawa et Suto nous aurions pu rechercher leur pureté à l'aide de l'analyse élémentaire, mais nous n'aurions pu affirmer l'absence de pertes dues à des altérations nées des traitements successifs.

Nous nous bornerons aux groupes 3 et 4, à comparer nos acides à ceux de Kumagawa et Suto.

(*) Obtenu par lavage à l'éther, de la solution aqueuse, d'où l'on a éliminé l'acétone.

(**) Obtenu par lavage à l'éther, de l'extrait sec de la solution aqueuse précédente, d'où il était apparent qu'elle n'avait pas été épuisée par le premier éther.

Troisième groupe d'expériences.

EXPÉRIENCE 1

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction acétone-alcool.

Sérum pris : 30 centimètres cubes.

Acétone de précipitation : 650 centimètres cubes.

Il faut pousser la distillation de l'acétone dans le vide vers 45-50° jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mousse. Ayant arrêté trop tôt l'action du vide, il restait encore de l'acétone, lequel a entraîné une grande partie de l'eau dans l'éther quand on a fait agir celui-ci, de sorte que si l'on décante la portion aqueuse et qu'on la fasse bouillir dans le vide, on arrive à la dessécher presque complètement et sans trouble appréciable (on sait qu'elle est ordinairement lactescente), probablement parce que la plus grande partie des matières grasses a été prise par l'acétone et l'éther.

De son côté, l'*extrait-alcool*, repris par l'éther, laisse en dépôt un sable assez abondant. L'éther d'épuisement de cet *extrait-alcool* est presque incolore et laisse un sable très brun, tandis que l'éther d'épuisement de l'extrait acétonique est jaune d'or et a presque complètement tout dissous.

Tout le phosphore de l'extraction paraît se concentrer dans la solution éthérée. — Y a-t-il du phosphore dans le sable laissé par l'alcool? Il est bien soluble dans l'eau. Neutralisé par KOH, puis repris par AzO^3H et soumis à l'action du molybdate d'ammonium dans les conditions précisées ailleurs, on ne décèle point de phosphore, même au bout de quatre jours de repos.

Y a-t-il du phosphore dans la liqueur aqueuse acétonique épuisée par l'éther et où il était resté de l'acétone? La réponse est la même. L'eau dissout un peu moins bien, mieux avec KOH.

0 gr. 1260 représente le poids de l'extrait éther 65°. Le résidu, après passage à l'éther anhydre, paraît insoluble dans l'eau et ne pas être mouillé par l'eau.

Poids de l'extrait éther anhydre : 0 gr. 1225. A la loupe, cet extrait a l'aspect cireux et grenu. Il se dissout mal dans l'alcool à froid, complètement à chaud, en quelques secondes. Mis dans un matras avec 2 centimètres cubes NaOH alcool, la liqueur, de jaune pâle devient jaune ambré. Courant CO^2. Avant CO^2 la liqueur se trouble un peu, s'éclaircit à chaud. CO^2 détermine alors un trouble immédiat, puis la liqueur s'éclaircit à nouveau.

Enfin, il reste un précipité accompagné d'un retour de la couleur au jaune pâle. On filtre sur un papier un peu grand et dans un entonnoir à longue tige.

II. — Précipitation des savons d'argent.

Il faut environ 11 centimètres cubes NO^3Ag alcool. Cr O^4K^2 est bien le critérium certain de la fin de la réaction. Le précipité est d'un jaune un peu safran, ce qui est dû à l'entraînement par le sel métallique des impuretés qui accompagnent les acides gras. Par contre, le filtrat est presque incolore.

2 centimètres cubes NaOH alcool 1 p. 100 suffisent pour l'alcaliniser. En filtrant aussitôt, AgOH ne paraît pas réduit sensiblement, c'est-à-dire qu'on ne le voit pas passer du marron au noir. Pour hâter la filtration, employer un filtre assez grand et un entonnoir à longue tige. Recevoir le filtrat dans des petits verres, car parfois il passe trouble. De presque incolore qu'il était provenant des savons d'argent, cette fois, il est très légèrement ambré, ce qui provient de l'action de NaOH sur les petites impuretés organiques. On sait, en effet, que les produits biologiques brunissent au contact des alcalis et s'éclaircissent au contact des acides.

III. — Formation de la solution alcool insaponifiable.

Après avoir percé le filtre, ce dernier est projeté par des jets d'eau froide dans un petit matras. Ensuite on y ajoute le filtre lui-même, puis de l'eau et un volume d'éther à peu près égal ou supérieur, puis peu à peu AzO^3H 1/3. On agite

par rotation. Le savon qui avait surtout envahi l'éther est décomposé et on arrive à une limpidité parfaite des deux liquides. Quand au filtre, il reste bien blanc, même le lendemain, ce qui prouve que la lumière n'avait pas altéré le précipité d'argent.

La solution éthérée est jaunâtre, ce qui est dû vraisemblablement à ce que les impuretés entraînées par le sel d'argent ont été récupérées par l'éther.

Remarque. — Les savons d'argent n'ont pas été ici lavés à l'alcool. Seul l'éther a été employé. Il laisse un résidu blanc qui ressemble à de la cholestérine. De même, on lave également à l'éther le filtratum d'oxyde d'argent. Cet éther laisse un résidu blanchâtre, très faible, n'ayant cette fois aucune ressemblance avec la cholestérine. Ces deux résidus sont repris par l'éther et contribuent à laver la liqueur alcaline cholestérinique.

Dosage de l'insaponifiable (Cholestérine). — Quand il reste encore un peu d'alcool, c'est-à-dire avant distillation complète (et que des sels ont commencé à se déposer) on ajoute à peu près autant d'eau, ce qui accentue le trouble. En traitant par l'éther, dans l'expérience actuelle, ce trouble ne disparaît pas complètement. On évapore alors à part les éthers de lavage, puis on acidifie la liqueur alcaline avec NO^3H au 1/3. Cela ne paraît rien donner sur le moment, mais, agité énergiquement en présence d'éther, les deux liqueurs deviennent limpides. En revanche, l'éther qui était presque incolore quand il venait de la liqueur alcaline, se colore très légèrement en ambre avec la liqueur acide. En même temps cet éther évaporé laisse un résidu d'aspect cireux et huileux, d'odeur légèrement âcre, comme les acides gras impurs eux-mêmes. Dans ces conditions, on peut se demander si ce ne sont pas encore des acides gras qui auraient résisté dans ce cas là à l'entraînement argentique.

L'éther alcalin laisse un résidu presque blanc, sans odeur appréciable, presque entièrement soluble dans l'éther anhydre avec sa très légère coloration.

Le poids de l'extrait-éther absolu ainsi obtenu est de 0,0382, soit 1,27 p. 1000.

Reprise par l'éther de pétrole de l'*insaponifiable éther*

anhydre. — La solution passe la nuit au repos. Le lendemain se trouvent au fond de très légers fragments blancs et la solution claire a conservé le très léger ton jaunâtre qu'elle avait dans l'éther. La solution filtre limpide.

Poids de l'extrait pétrole : 0 gr. 0360, soit 1,20 p. 1000.

Dosage des acides gras. — Acides gras bruts tirés des savons d'argent. — Poids : 0,0773, soit 2,57 p. 1000. Ceux-ci ont été séchés plusieurs jours à 50°. Par inadvertance on les reprend par l'éther où l'extrait se montre à nouveau complètement soluble. Ils sont remis à l'étuve à 50° pendant 8 heures.

Les acides gras bruts commencent à fondre à 45°. Repris par le pétrole ils abandonnent un précipité rougeâtre notable. La solution reste trouble, mais si on prend soin de la laisser en vase clos et au repos pendant une nuit, on la retrouve très limpide, mais avec une coloration légèrement jaunâtre. Sur les parois du vase se trouve adhérent un précipité ocreux qui ne suit pas le liquide quand on le filtre, ce qu'il n'aurait pas manqué de faire si la filtration avait été immédiate et faite sur un filtre insuffisant (trop faible épaisseur d'amiante).

Poids des acides gras (pétrole) : 0 gr. 0801.

Oxydation des acides gras. — Comme on le voit, il existe une augmentation de poids notable, témoignant d'une oxydation sous l'influence de l'air. Dans les expériences précédentes on avait trouvé une diminution logique. Ne faut-il pas expliquer l'augmentation présente par suite des conditions imposées au séchage : 1° Evaporation spontanée à l'air (durée 10 à 11 h.); 2° Séchage prolongé à l'étuve 50°, deux jours environ? L'action de l'air paraît avoir une influence plus nuisible sur l'altération des acides que l'action de la chaleur. Il peut y avoir aussi une cause provenant de la nature des acides, suivant la prédominance des uns ou des autres, les acides non saturés étant plus altérables (acide oléique).

Le résidu ocreux laissé par le pétrole pèse 0 gr. 0037, poids qui, soustrait de 0 gr. 0773, donne 0,0736, soit 2,45 p. 1000.

Dissous dans l'alcool distillé, l'extrait de pétrole 0, 0801 exige 2 cent. cubes 6 de NaOH N/10. Acide stéarique déduit $= (2,6 \times 0,004 = 0,0104) \times 7,1 = 0,0738$. Remarquer la concordance avec le chiffre 0, 0736 trouvé précédemment.

Ceci montre que la titrimétrie paraît n'intéresser que les acides lipoïques non oxydés. Nous avons noté plusieurs fois ce fait.

Lécithine. — La lécithine n'a pas été dosée dans cette expérience.

Traitement du précipité protéique par la saponification de Grigaut. — Ce traitement a pour but de s'assurer s'il existe un résidu liposique témoignant d'une extraction insuffisante.

Or, ce résidu est trouvé égal à 0,0006 et peut, en somme, être négligé.

L'expérience suivante confirme cette manière de voir.

EXPÉRIENCE 2.

MÉTHODE PONDÉRALE DE GRIGAUT

En effet, 20 centimètres cubes du même sérum sur lequel a porté l'expérience précédente sont traités conformément à la technique pondérale de Grigaut.

Le poids de cholestérine ainsi obtenu est de 0,0251 pour 20 centimètres cubes, soit 1,24 p. 1000, chiffre sensiblement d'accord avec celui de 1,20 que nous avons obtenu par l'expérience n° 1.

EXPÉRIENCE 3.

MÉTHODE DE KUMAGAWA-SUTO-SHIMIDZU ET GRIMBERT-LAUDAT

I. — Extraction et formation de l'extrait-éther absolu.

Procédons exactement d'après la technique de Kumagawa-Suto-Shimidzu, Grimbert et Laudat (voir p. 96).

Nous arrivons à l'*extrait éther anhydre*, dont le poids est · 0 gr. 0606.

Après extraction à l'éther, il reste un résidu jaune brun, presque entièrement soluble dans l'eau. L'extrait éthéré est d'aspect cireux, jaune, avec, semble-t-il, quelque inclusions cristallines.

Le filtratum a été épuisé dans l'appareil de Kumagawa et Suto pendant au moins 8 heures.

L'extrait éthéré des acides gras, après passage à l'étuve 50° pendant 2 heures, laisse des aiguilles blanches incluses dans une huile fluide.

II. — **Saponification. Extrait-éther-absolu acide.**

Cet éther laisse un faible résidu. Pesé après environ 6 heures d'étuve 50° il donne : 0 gr. 0550.

Repris par l'éther de pétrole (légèrement jaunâtre) il pèse : 0 gr. 0539, soit 2,69 p. 1000.

III. — **Insaponifiable.**

Le mélange précédent est dissous dans environ 40 à 50 centimètres cubes de pétrole, versé dans une ampoule à décantation où l'on ajoute 2 centimètres cubes NaOH 1 p. 100. Agitation énergique. Repos d'une demi-heure environ au terme duquel se sépare à la partie inférieure 1/2 centimètre cube environ d'un liquide assez fortement jaunâtre et clair. Après addition de 2 centimètres cubes H^2O et agitation. il se sépare un liquide légèrement jaunâtre d'un volume d'environ 4 centimètres cubes. Il est limpide ainsi que le pétrole surnageant qui, lui, est incolore.

Les pétroles évaporés spontanément laissent une matière blanchâtre, sans ressemblance avec la cholestérine. On la traite alors par 1/2 centimètre cube Na OH alcool 1 p. 100 + quelques centimètres cubes alcool, on évapore au bain-marie et sèche à l'étuve au voisinage de 100°. Le résidu est blanc par places, jaune assez foncé en d'autres endroits.

Repris par le pétrole, il faut attendre une heure environ avant d'obtenir l'éclaircissement de celui-ci. Filtré sur amiante, il arrive à passer limpide après plusieurs repassages, mais il est jaunâtre, tandis que la matière restante est plutôt blanche.

Evaporé et porté à 100°, il laisse les houppes caractéristiques de la cholestérine, mais légèrement jaunâtres, dont le poids est : 0 gr. 0274, soit 1,37 p. 1000.

IV. — **Acides Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat transformés en savons d'argent et isolés à nouveau par notre méthode.**

On a obtenu la somme totale de la cholestérine et des acides gras, soit 0 gr. 0539, par la méthode Kumagawa et Suto. On en a séparé la cholestérine par la même méthode. La portion alcoolo-aqueuse sodique restante, additionnée d'une nouvelle petite quantité d'alcool, est neutralisée par CO^2, puis filtrée. Le lendemain on est obligé de refiltrer, vu la formation d'un précipité nouveau abondant, non soluble sous l'influence de la chaleur. Filtration un peu lente, plus rapide quand on a chauffé et après refroidissement. Lavage à l'alcool et, après avoir entouré le matras d'un papier noir, précipitation des acides avec 5cc,5 de NO^3Ag. Filtration dans la chambre photographique, lavage à l'éther. Le filtrat est un peu jaune, couleur chromate de plomb clair. Les acides séparés sont séchés à 50° pendant 4 heures et pesés, 0 gr. 0257, qui est ainsi le poids de l'*extrait-éther aqueux acide*. Ils sont un peu jaunes mais, repris par l'éther de pétrole, ils deviennent bien blancs.

Acides gras	0 gr. 0222
Insaponifiable Kumagawa-Suto-Shimidzu, Grimbert et Laudat.	0 gr. 0274
Acides lipoïques + insaponifiable	0 gr. 0496

La différence 0,0539 — 0,0496 = 0,0043 peut représenter les acides résiduels enlevés par le pétrole avec l'insaponifiable.

Comme vérification titrimétrique, les acides lipoïques que nous venons d'isoler, soit le poids de 0,0222, sont dissous, comme à l'habitude, dans 25 centimètres cubes d'alcool 95° et titrés à la soude NaOH N 10, dont 0 cent. cubes 7 sont nécessaires. On en déduit le poids de 0,0198 d'acide stéarique. Ce poids est peut-être un peu faible, mais suffit néanmoins à

nous faire considérer le poids d'acides lipoïques trouvés pondéralement, 0,0222, comme suffisamment pur et acceptable.

D'autre part, nous avons trouvé, comme on sait :

Acides lipoïdes + insaponifiable Kum. Suto	= 0,0539
Insaponifiable (cholestérine)	= 0,0274
Acides lipoïques Kumagawa-Suto	= 0,0265

On retrouve ainsi, à très peu près, surtout si l'on tient compte des acides résiduels, le poids des mêmes acides lipoïques que nous avons fait passer à l'état de savons d'argent pour les isoler à nouveau. C'est là une nouvelle justification de notre procédé aux savons d'argent.

Tableau résumé des Expériences 1, 2 et 3 du 3me Groupe.

EXTRAITS DU SÉRUM	EXPÉRIENCE 1 — MÉTHODE ACÉTONE SAVONS D'ARGENT		EXPÉRIENCE 3 — MÉTHODE KUMAGAWA-SUTO		EXPÉRIENCE 2 — MÉTHODE PONDÉRALE GRIGAUT	
	Pour 30 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000
Extrait-éther 65° total . .	0,1260	4,20	»	»		
— — absolu total.	0,1225	4,08	0,0606	3,03		
— — — acide.	»	»	0,0550	2,75		
— — de pétrole acide (acides lipoïques + insaponifiable)	»	»	0,0539	2,69		
Saponification et précipitation argentique :						
Extrait-éther absolu d'insaponifiable	0,0382	1,27	»	»		
Extrait-éther de pétrole du précédent (cholestérine)	0,0360	1,20	0,0274	1,37	0,0248	1,24
Acides lipoïques par différence	»	»	0,0265	1,32		
Extrait-éther 65° brut . .	0,0773	2,57	»	»		
— — de pétrole du précédent (acides lipoïques oxydés)	0,0801	2,66	»	»		
Excès par oxydation . . .	0,0028	0,09	»	»		
Résidu solide laissé par le pétrole précédent . . .	0,0037	0,12	»	»		
Acides lipoïques déduits : 0,0773-0,0037.	0,0756	2,45	»	»	(Acidimétrie en acide stéarique:	2,46
Évaluation des acides lipoïques de la solution éthylo-aqueuse (savons alcalins) méthode Kumagawa-Suto Shimidzu et Grimbert-Laudat, en les transformant en savons d'argent :						
Extrait-éther aqueux acide	»	»	0,0257	1,28		
— — de pétrole acide	»	»	0,0222	1,11	(en acide stéarique:	0,99
Extrait-éther de pétrole acide (insaponifiable déjà dosé)	»	»	0,0274	1,37		
Acides lipoïques + insaponifiable	»	»	0,0496	2,48		
Acides résiduels retenus par l'insaponifiable déjà dosé : 0,0539 — 0,0496.	»	»	0,0043	0,21		

Nous n'avons rien à dire sur le temps opératoire de l'extraction, qui est totale comme dans les expériences des premier et deuxième groupes.

Les seules réserves à formuler concernent toujours les acides lipoïques, non seulement pour les raisons déjà émises, mais encore ici parce qu'ils ont été déduits d'un *extrait-éther* et d'un résidu sur la nature desquels nous n'étions pas complètement éclairés. Cependant, ces réserves diminuent singulièrement d'importance si l'on tient compte de l'étroite concordance entre les nombres pondéraux et les nombres fournis par l'acidimétrie volumétrique. Malheureusement, cette concordance ne suffit pas à établir la pureté des acides lipoïques. En effet, une impureté acide exige d'autant plus, en poids, d'alcali, pour être neutralisée, que son poids moléculaire est plus faible. Si maintenant nous comptons cet alcali comme acide stéarique, celui-ci donnera un gros chiffre qui masquera l'impureté, avec une apparence d'autant plus trompeuse que ce chiffre s'élèvera davantage au voisinage du nombre pondéral.

Notre impression à cet égard peut se fortifier de ce fait que le poids trouvé des acides gras Kumagawa-Suto est seulement les 53,87 p. 100 des acides gras trouvés par notre méthode.

Nous verrons si c'est là un fait susceptible de généralisation ou s'il est seulement particulier aux expériences dont il est déduit. En attendant, notons que les acides gras obtenus par la technique Kumagawa-Suto ne subissent aucune modification de qualité ou de quantité quand ils sont repris et soumis à notre méthode des savons d'argent. D'où l'on peut déduire que si nous nous bornions à l'extraction alcoolique, en supprimant l'acétone, nos résultats concorderaient avec ceux de Kumagawa-Suto-Shimidzu.

Nous verrons plus tard que supprimer l'acétone serait non seulement inutile mais tout au moins fâcheux.

Quatrième groupe d'expériences.

EXPÉRIENCE I

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT AVEC MODIFICATIONS

20 centimètres cubes de sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes acétone. On filtre de suite et l'on distille. Lavage du filtratum à l'alcool. Le filtrat est reçu dans un cristallisoir.

Filtrat-Acétone. — On évapore presque entièrement au bain-marie. La dessiccation est achevée à l'étuve 50° pendant plusieurs heures. On reprend et on lave par l'alcool chaud, lequel laisse un peu de substance granuleuse, jaune safran. Cette substance, malgré le lavage à l'alcool chaud, séchée à 50°, abandonne encore à l'éther anhydre un peu de matières grasses que l'on néglige ici. Dans d'autres expériences nous avons adopté le lavage direct à l'éther absolu.

Les alcools sont réunis et directement saponifiés, sans passer par l'extrait d'éther, au moyen de 6 centimètres cubes NaOH 1 pour 100. Evaporation, reprise par l'eau chaude, AzO^3H dilué et éther. Evaporation de la portion éther et de la portion eau. Traitement de l'extrait éther par le pétrole et de la portion eau pour le phosphore.

Extrait-éther-aqueux acide brut (avec insaponifiable). ..... 0 gr. 0838

Extrait-pétrole acide issu du précédent, conformément à la méthode Kumagawa-Suto et Grimbert-Laudat, 0 gr. 0809.

En reprenant l'extrait par l'alcool chaud, une petite masse sableuse ne se dissout pas.

On a employé 30 centimètres cubes d'alcool chaud versés dans un matras sans filtrer. On ajoute 1 goutte phtaléine; 1 cent. cube 05 de Na OH alcool (*) sont nécessaires pour le virage. D'autre part, il en faut 0 cent. cube 6 pour neutraliser 1 centimètre cube de SO^4H^2 N/10, ce qui porte la richesse de la solution éthylo-sodique à 0 gr. 0066 NaOH par centimètre cube, d'où l'on déduit pour l'acide stéarique correspondant 0 gr. 0468 et puisque 1 cent. cube 1 de

(*) NaOH alcool veut dire solution de NaOH dans l'alcool.

soude sont nécessaires pour le virage, ceci correspond à 0 gr. 0468 × 1,1 = 0 gr. 0514 d'acide stéarique (*). Ce nombre s'accorde avec le suivant 0 gr. 0485, qui est l'*extrait-éther aqueux acide* provenant des savons d'argent.

Aucun précipité ne se manifeste dans la neutralisation.

L'alcool bouillant ayant repris les acides gras bruts laisse, comme on a vu, un léger résidu blanc, en dépôt pour ainsi dire stratifié, insoluble dans l'eau et soluble dans l'éther, qu'on ne peut cependant pas attribuer à des acides lipoïques (à moins de les supposer altérés) puisque ceux-ci sont solubles dans l'alcool, surtout chaud.

La *solution-alcool* précédente est traitée par le *nitrate argent-alcool* à la manière ordinaire, ce qui donne lieu à un précipité argentique et à un filtrat-alcool.

On verra qu'ici le nitrate d'argent n'a pas entraîné tous les acides gras présents, sans doute par suite de l'indétermination de sa quantité non évaluée par le chromate de potassium.

Filtrat-alcool. — Le filtrat alcool séparé des savons d'argent est simplement évaporé au bain-marie avec son oxyde d'argent. Comme on avait négligé par oubli d'ajouter NaOH, on fait intervenir cet alcali alcoolique en léger excès, — révélé par la phtaléine — seulement vers la fin de l'évaporation. On évapore à sec, puis sèche à 50°. Le résidu est naturellement noir. Après avoir été soumis à la dessiccation pendant plusieurs heures, on le reprend directement par l'éther de pétrole, espérant que celui-ci s'emparera de l'insaponifiable seul. On filtre sur amiante-coton. Le filtrat passe jaune brun. Est-ce à la présence de l'oxyde d'argent qu'il faut attribuer cette coloration? (Quoique passé à l'étuve pendant plusieurs jours, le pétrole redissout la matière colorante avec la même facilité, l'éther également).

L'extrait éther anhydre de lavage des savons d'argent (**), probablement composé surtout de cholestérine, est repris par le pétrole et joint au précédent.

(*) Au lieu de titrer nos solutions d'acides lipoïques au moyen de NaOH N/10, comme nous l'avons fait précédemment, nous les titrerons dorénavant par la solution NaOH dont nous venons de déterminer la richesse.

(**) Cet extrait n'a pas été pesé. L'éther évaporé laisse des aiguilles blanches visibles à l'œil nu, solubles dans l'éther de pétrole auquel elles abandonnent des particules blanchâtres et brunes, probablement dues à de l'argent.

Remarque. — Le résidu laissé par le pétrole, repris par l'eau et filtré, passe jaune brun. Il est neutre au tournesol. IV ou V gouttes de lessive de soude le rougissent (phtaléine). Il s'agit de savoir s'il contient des acides gras. On ajoute donc HCl dilué et on chauffe légèrement. On n'observe pas de formation d'acides gras. On lave alors à l'éther qu'on évapore et le résidu est pesé : 0 gr.0003.

Traitement de l'extrait de pétrole brun. — Le pétrole et l'éther redissolvent cet extrait. On a négligé involontairement d'essayer l'alcool. L'eau délaie sans dissoudre, même chaude, même alcaline. On fait tomber ce mélange aqueux alcalin dans une ampoule à robinet. Un épuisement à l'éther fournit une solution très foncée. Il faut faire agir l'éther à trois reprises, mais on ne parvient pas à décolorer la portion aqueuse. On y arrive instantanément, au contraire, en l'acidulant HCl. Les deux solutions éthérées ainsi obtenues sont évaporées à part et soumises à l'action de l'alcool. Il semble bien que le pigment brun soit argentique, comme on pouvait le prévoir, à en juger d'après l'aspect du léger dépôt sur la douille de l'ampoule, dans la portion acide. Les deux solutions alcooliques sont évaporées à part et pesées :

Extrait alcool basique..... 0 gr. 0109

Cet extrait à l'aspect d'acides gras au lieu de présenter l'aspect de la cholestérine, comme on pouvait s'y attendre.

Extrait alcool acide..... 0 gr. 0114

Cet extrait a plutôt l'aspect de la cholestérine mais néanmoins mélangée d'une assez forte proportion d'acides gras. La soude alcoolique titrée donne avec lui 0 cent. cubes 2, d'où acide stéarique = 0,0066 × 0,2 × 7,1 = 0,0093.

Le premier extrait, repris par l'alcool bouillant, est versé sur le second, alcalinisé comme ci-devant.

Poids total des deux extraits ainsi réalisés par évaporation du pétrole..... 0 gr. 0108

Point de fusion plus élevé que celui de l'acide stéarique, vers 115°. La soude alcoolique titrée donne 0 cent. cubes 04, soit : Acide stéarique = 0,0066 × 7,1 × 0,04 = 0,0018. Cet extrait représente de la cholestérine, sinon la totalité, au moins la plus grande partie.

Les deux résidus brun noir laissés par l'alcool sont solubles dans NO^3H chaud, sauf de petites plaquettes blanchâtres dont il est difficile de connaître la nature. La solution nitrique étendue d'eau et traitée par HCl, on obtient un précipité blanc révélateur de l'argent, venant confirmer nos prévisions.

Extrait-alcool basique + Extrait-alcool acide = (0,0109 + 0,0114) = 0,0223 ce qui représente le poids de la cholestérine + acides lipoïques résiduels, que l'on peut traduire approximativement par le poids calculé d'acide stéarique, d'où l'on a :

Cholestérine = 0,0223 — 0,0093 = 0,0130.

Acides lipoïques totaux = 0,0069 + 0,0093 = 0,0162 (*).

0,0069 représente les acides lipoïques libérés de leur combinaison argentique.

En effet, l'*extrait-éther aqueux* provenant des savons d'argent, repris par le pétrole, donne : 0 gr. 0069.

Comme on voit, les acides gras totaux sont loin d'avoir été tous précipités sous forme argentique, par suite de la conduite défectueuse de l'expérience n° 1.

Les artifices expérimentaux par lesquels nous avons essayé de la corriger n'ont pas suffi, et le nombre obtenu pour les acides, comme nous le constaterons, n'est pas en accord avec l'expérience 3. De toutes façons, il ne pouvait être qu'approximatif, puisque certains d'entre les autres nombres, dont il est l'aboutissant, ont été évalués par acidimétrie volumétrique traduite en acide stéarique.

EXPÉRIENCE 2.

MÉTHODE PONDÉRALE DE GRIGAUT.

C'est la méthode pondérale de Grigaut qui fait l'objet de cette expérience.

Pour 20 centimètres cubes de sérum elle fournit un poids d'insaponifiable = à 0 gr. 0158, soit 0,79 p. 1000

(*) En additionnant membre à membre les deux égalités, on obtient l'identité : 0,0292 = 0,0292. Ceci ne doit pas surprendre puisque 0,0223 est composé de la cholestérine et des acides résiduels qui lui sont mélangés. Il suffit donc d'ajouter les acides lipoïques 0,0069 issus des savons d'argent, pour obtenir le total cholestérine + acides lipoïques totaux = 0,0292. Mais comme ces deux égalités ont été établies indépendamment l'une de l'autre, l'identité obtenue, comme nous venons de le voir, constitue une intéressante vérification.

Cet insaponifiable, dissous dans l'alcool, vire immédiatement à la phtaléine sous l'influence de la soude alcoolique que nous avons titrée page 226, et qui nous servira seule désormais.

EXPERIENCE 3.

METHODE DE KUMAGAWA-SUTO-SHIMIDZU ET GRIMBERT-LAUDAT

20 centimètres cubes de sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes d'alcool 95°. Filtration. On épuise ensuite à l'appareil Kumagawa et Suto. Evaporation de l'alcool. Séchage pendant plusieurs heures à 50° jusqu'à poids constant. Reprise par l'éther anhydre, filtration sur coton-amiante. Le filtrat, limpide, passe presque complètement incolore. Evaporé, le filtrat laisse une masse amorphe, d'aspect gras.

L'extrait alcool, épuisé par l'éther, laisse un résidu qui est loin d'être complètement soluble dans l'eau.

Extrait éther anhydre..... 0 gr. 0382

Après saponification on obtient :

Extrait de pétrole (acides lipoïques blancs, sans odeur appréciable + cholestérine)..... 0 gr. 0400

Par inadvertance on a continué par notre procédé jusqu'à la formation des savons d'argent exclusivement, c'est-à-dire qu'après avoir repris par 30 centimètres cubes d'alcool chaud (solution complète) on a neutralisé à la phtaléine par NaOH alcoolique (donnant à $SO^4H^2N/10$, pour 1 cent. cube, $0^{cc},6$ de NaOH) dont il faut 0 cent. cube 4 + 1 goutte pour neutraliser la solution alcoolique des acides lipoïques précédents, ce qui, traduit en acide stéarique, devient 0,0196.

On continue d'après la méthode Kumagawa et Suto, c'est-à-dire qu'à la solution alcoolique de savon on ajoute de l'éther de pétrole et l'on agite le tout dans une ampoule à décantation. On ajoute environ 75 centimètres cubes d'éther de pétrole aux 30 centimètres cubes de solution savonneuse d'alcool et on agite soigneusement dans l'ampoule de 250 centimètres cubes. Une séparation s'établit et il ne semble pas que la solution alcoolique ait sensiblement augmenté de volume. On ajoute alors environ 30 centimètres cubes d'eau. Les deux portions sont limpides.

Après avoir séparé la partie inférieure, la solution aqueuse, dont la limpidité n'est pas parfaite (léger louche), on remet celle-ci dans l'ampoule et on lave avec 30 à 40 centimètres cubes d'éther de pétrole.

Le lendemain la portion aqueuse devient limpide.

Extrait-éther de lavage de la portion alcoolo-aqueuse réduite au bain-marie et acidulée, provenant de l'épuisement par le pétrole de cette portion basifiée par la soude. — Poids de cet extrait..... 0 gr. 0141 (*)

A la loupe, la masse est blanche, à peine jaunâtre et paraît composée uniquement d'acides gras. Neutralisée par NaOH titré, 0 cent. cube 3 + I goutte, sont exigés, soit 0 cent. cube 32 puisqu'il y a V gouttes pour 0,1, soit : 0,0066 × 0,32 × 7,1 = 0,0149 en acide stéarique.

Extrait de pétrole de lavage brut (insaponifiable). — Poids de cet extrait..... 0 gr. 0252

Traité par notre alcool sodé titré — dont la quantité traduite en acide stéarique est de 0,0046 — puis par un excès, pour respecter les indications de Kumagawa-Suto, évaporé à sec ensuite à 100°, il est enfin repris par l'éther de pétrole, ce qui fournit le poids de l'insaponifiable (cholestérine). 0 gr. 0124

Cette cholestérine est bien blanche.

Acides lipoïques par différence :

0 gr. 0400 — 0,0124 = ... 0 gr. 0276.

On peut traduire en acide stéarique les acides lipoïques de la manière suivante : il suffit de reprendre celui qui a été exprimé par le nombre 0,0149 et qui provient de la portion alcoolo-aqueuse ci-dessus; en lui ajoutant 0,0046, on trouve 0,0195, nombre identique à 0,0196 obtenu sur l'extrait de pétrole 0,0400 page 229.

(*) Nous avons pris l'initiative d'évaluer cet extrait. Il n'est pas déterminé au cours de la technique Kumagawa-Suto et Grimbert-Laudat.

Tableau résumé des expériences 1, 2, 3, du 4e groupe.

EXTRAITS DU SÉRUM	EXPÉRIENCE 1 — MÉTHODE ACÉTONE SAVONS D'ARGENT MODIFIÉE		EXPÉRIENCE 3 — MÉTHODE KUMAGAWA-SUTO		ACIDIMÉTRIE EN ACIDE STÉARIQUE		EXPÉRIENCE 2 — MÉTHODE GRIGAUT	
	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20cc.	Pour 1000	Pour 20cc.	Pour 1000	Pour 20cc.	Pour 1000
Extrait-éther-absolu.	»	»	0,0382	1,91	»	»	»	»
— de pétrole	»	»	0,0400	2,00	0,0196	0,98	»	»
I. — Saponification.								
Extrait-éther aqueux acide avec insaponifiable	0,0838	4,19	»	»	»	»	»	»
Extrait-éther-pétrole du précédent . . .	0,0809	4,04	»	»	0,0514	2,57	»	»
Filtrat-alcool-extrait basique.	0,0109	0,54	»	»	»	»	»	»
Filtrat-alcool-extrait acide	0,0114	0,57	»	»	0,0093	0,46	»	»
total.	0,0223	1,11	»	»	»	»	»	»
Extrait pétrole des précédents	0,0108	0,54	»	»	»	»	»	»
Insaponifiable, 0,0223-0,0093 = ...	0,0130	0,65	»	»	»	»	»	»
Extrait pétrole insaponifiable brut . .	»	»	0,0252	1,26	0,0046	0,23	»	»
Extrait pétrole 2e reprise.	»	»	0,0124	0,62	»	»	0,0130	0,65
Acides lipoïques par différence (0,0400-0,0124 = ...	»	»	0,0276	1,38	»	»	»	»
Extrait pétrole de l'extrait éthylo-aqueux	»	»	0,0141	0,70	0,0149	0,74	»	»
Acides lipoïques exprimés en acide stéarique 0,0149 + 0,0046	»	»	»	»	0,0195	0,97	»	»
II. — Précipité argentique.								
Extrait éther aqueux acide.	0,0485	2,42	»	»	»	»	»	»
Extrait pétrole . . .	0,0069	0,34	»	»	»	»	»	»
Acides lipoïques totaux 0,0069 + 0,0093 =	0,0162	0,81	»	»	»	»	»	»
Phosphomolybdate .	0,0655	»	0,0667	»	»	»	»	»
Lécithine	0,0284	1,42	0,0290	1,45	»	»	»	»

On doit remarquer, dans ce tableau, la coïncidence des nombres relatifs à la cholestérine et à la lécithine. En revanche, nous ne pouvons tirer aucune conclusion relativement aux acides gras, ceux-ci ayant été évalués dans l'expérience 1 au moyen d'artifices sur lesquels il serait imprudent d'asseoir une certitude.

Cinquième groupe d'expériences.

EXPÉRIENCE 1

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction acétone-alcool et formation de l'extrait-éther-absolu total.

20 centimètres cubes d'un nouveau sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes acétone.

Dans cette opération, nous allons traiter séparément, par l'éther absolu, l'extrait acétonique provenant d'un épuisement au moyen de l'appareil Kumagava et Suto et l'extrait alcoolique obtenu de même.

La solution acétonique d'épuisement est jointe à la première solution de précipitation. Des deux, on fait l'extrait sec qui est épuisé à son tour à l'éther absolu.

Poids de l'extrait éther anhydre provenant de l'extrait acétonique..... 0 gr. 0604

A la loupe il se présente sous l'aspect de fines aiguilles blanches centrées, incluses dans un magma gras de couleur brune.

Poids de l'extrait alcool brut..... 0 gr. 0240

On retrouve un certain nombre de groupes d'aiguilles centrées blanches, perdues, comme pour l'extrait provenant de l'acétone, dans une petite quantité de magma gras jaunâtre. La présence de ce magma semble démontrer qu'un épuisement complet à l'acétone à chaud est insuffisant pour attirer à lui la totalité des acides gras. Peut-être est-ce une simple question de température? Nous avons déjà discuté cette question.

Nous reprenons cet *extrait-alcool* par l'éther anhydre,

lequel laisse indissoute une matière cireuse brune qui s'attache à l'agitateur. Le filtrat éther est parfaitement incolore.

La matière cireuse, insoluble dans l'éther, est complètement soluble dans l'eau. Pour savoir si elle contient des savons ou une autre matière contenant des acides gras insolubles, on chauffe la solution aqueuse, légèrement jaunâtre, et on ajoute HCl dilué. Cet acide ne provoque aucun trouble dans la solution, ni à chaud ni à froid. Si on chauffe à nouveau, on n'observe pas d'odeur appréciable. Par refroidissement, la liqueur ne change pas d'aspect et l'éther n'en retire rien.

Poids de l'extrait-éther-anhydre provenant de l'extrait alcool..... 0 gr. 0034

A la loupe, cet extrait, blanc, est composé de longues aiguilles, mélangées en petite quantité d'une substance d'aspect gras.

Extrait-éther absolu total : 0.0604 + 0.0034 . . . = 0 gr. 0638 (*)

La saponification de cet extrait donne un :

Extrait-éther aqueux acide (acides lipoïques, insaponifiable, etc.) dont le poids . . . . . = 0 gr. 0528

Ce dernier extrait, jaune brun, est directement traité par l'alcool, sans passer par l'éther de pétrole, puis neutralisé en présence de phtaléine par 0 cent. cube 63 de NaOH alcoolique, ce qui correspond à 0.0298 en acide stéarique, soit 1,49 p. 1000. Il est ensuite précipité par 1 cent. cube 1 de NOAg et filtré.

II. — Précipitation argentique et dosage des acides gras.

Le précipité, lavé à l'éther, est introduit avec son filtre dans un matras et immédiatement traité comme à l'ordinaire. L'éther est évaporé.

Poids du résidu (acides gras bruts)..... 0 gr. 0280

Repris par l'éther de pétrole, il reste un résidu blanc

(*) De cela on déduit que l'extrait-éther-absolu-acétone vaut les 94,67 p. 100 de l'extrait-éther-absolu total. Dans une autre expérience nous avons trouvé 91 p. 100. Kumagawa et Suto donnent seulement 62 p. 100 pour les poudres de tissu musculaire.

adhérent au verre et une sorte de sable insoluble. La liqueur passe limpide et incolore. Elle fournit un extrait de pétrole à..... 0 gr. 0198

Repris par l'alcool bouillant, cet extrait exige de notre solution alcoolique titrée, 0 cent. cube 45 NaOH correspondant à 0,0210 en acide stéarique, soit 1,05 p. 1000.

III. — **Filtrat-alcool et dosage de l'insaponifiable.**

L'excès d'argent est précipité par NaOH alcool dont 1 cent. cube 5 environ est nécessaire. La fin de la réaction est indiquée par le rougissement de la phtaléine, qu'on aperçoit facilement en regardant de haut en bas sur un papier blanc. Le filtrat passe coloré en rose. On l'évapore directement au bain-marie, le sèche à 100° et en fait l'extrait de pétrole de l'insaponifiable, dont le poids est 0 gr. 0172.

Cet extrait, qui fond entre 145° et 148°, est disposé en houppes blanches, soluble complètement dans l'alcool. Virage à 1 goutte NaOH alcool avec phtaléine. Ce corps est donc neutre.

EXPÉRIENCE 2

MÉTHODE PONDÉRALE DE GRIGAUT

La méthode pondérale de Grigaut, qui fait l'objet de cette expérience, fournit un poids de 0,0162 d'insaponifiable pour 20 centimètres cubes, soit 0.81 p. 1000, cholestérine parfaitement neutre à notre soude alcoolique titrée, exactement comme la cholestérine obtenue par la méthode acétone-savons d'argent à laquelle elle s'identifie.

EXPÉRIENCE 3

MÉTHODE DE KUMAGAWA-SUTO-SHIMIDZU ET GRIMBERT-LAUDAT

20 centimètres cubes du même sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes alcool.

Poids de l'*extrait-éther anhydre* provenant directement de l'extraction. . . . . 0 gr. 0354

Cet extrait est formé de fines aiguilles blanches incluses dans un magma gras de couleur jaune pâle.

Poids de l'*extrait-pétrole* provenant de la saponification (acides lipoïques + insaponifiable). . . . . 0 gr. 0357

Cet extrait est presque blanc. Ce sont surtout les houppes de cholestérine qui paraissent.

Poids de l'*insaponifiable* (cholestérine) . . . . . 0 gr. 0164

Acides lipoïques par différence. . . . . 0 gr. 0193

EXPÉRIENCE 4

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction acétone-alcool et formation de l'extrait-éther absolu total.

20 centimètres cubes du même sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes d'acétone.

Poids de l'*extrait-éther absolu total* provenant directement de l'extraction . . . . . 0 gr. 0854

Cet extrait se présente sous la forme de très nombreuses aiguilles centrées, probablement de cholestérine, incluses dans un magma de couleur brune.

Poids de l'*extrait-éther-acide* (acides gras + cholestérine, etc.). . . . . 0 gr. 0588

Cet extrait est traité par le pétrole, en imitation de la méthode Kumagawa-Suto et Grimbert-Laudat.

Poids de l'*extrait-éther de pétrole acide* provenant du précédent. . . . . 0 gr. 0409

Cet extrait est blanc. Ce sont surtout les houppes de cholestérine qui paraissent. Repris par l'alcool chaud, il laisse un faible résidu blanc, adhérent au verre, qui ne paraît pas soluble dans l'eau.

II. — Formation des savons d'argent.

Neutralisation de la solution alcoolique : 0 cent. cubes 4 + 1/3 de centimètre cube de la solution alcoolique NaOH dont il faut 0 cent. cube 6 pour neutraliser 1 centimètre cube $SO^4H^2N/10$ (vérifié à nouveau après plusieurs jours). Ceci correspond à 0,0201 en acide stéarique, soit 1,05 p. 1000. 0 cent. cube 5 de NO^3Ag suffit pour faire virer le chromate

et 0 cent. cubes 4 + 3/4 de centimètre cube NaOH sont nécessaires pour obtenir le revirage de la phtaléine. Si on a soin de laisser reposer 10 minutes environ le précipité AgO, la filtration est très rapide. AgO est lavé avec de l'éther qui est joint à l'éther de lavage des savons d'argent.

III. — Dosage des acides gras et de l'insaponifiable.

Poids de l'*extrait-éther-aqueux-acide* provenant des savons d'argent (acides gras un peu jaunâtres) . . . . . 0 gr. 0196

Repris par l'éther de pétrole, il laisse une petite quantité de résine soluble dans l'alcool en jaune clair.

Le pétrole, évaporé, donne un extrait formé des acides lipoïques purs = à . . . . . 0 gr. 0191

Quant à l'*insaponifiable* (cholestérine) obtenu à la manière habituelle, son poids est de . . . . . 0 gr. 0176

Matière bien blanche et neutre puisqu'une seule goutte de notre solution alcoolique de soude suffit pour faire virer la liqueur en présence de phtaléine.

Point de fusion : 145-147°

Remarque. — Dans le but d'opérer sur une plus grande quantité de substance, le résidu acétonique de cette expérience, joint au résidu acétonique de l'expérience 1, provenant l'un et l'autre des lavages à l'éther anhydre, sont repris par l'eau où ils sont presque immédiatement et entièrement solubles, et filtrés. Le filtrat passe un peu louche. Y a-t-il encore dans ce filtrat des acides gras sous forme de savons? On traite par HCl dilué, lequel ne provoque aucune accentuation du louche. De l'éther ajouté et agité ne supprime pas ce louche; cet éther lui-même, par évaporation, ne donne pas de quantité appréciable de résidu.

EXPÉRIENCE 5

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT

I. — Extraction acétone-alcool. — Extrait-éther-absolu total. — Saponification.

20 centimètres cubes du même sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes d'acétone.

Poids de l'*extrait-éther-anhydre*. . . . . 0 gr. 0844

Extrait-éther-aqueux-acide brut (acides lipoïques, cholestérine, etc.) . . . . . 0 gr. 0565

Cet extrait est formé de petites aiguilles rayonnantes autour d'un centre. La *solution-éther* dont il est tiré a été lavée au moyen d'une solution de *citrate de sodium* dont l'emploi sera légitimé chap. IV page 255. Le citrate de sodium a pour effet d'assurer un lavage rapide et facile. Il neutralise les impuretés acides (NO^3H, acide lactique) en les faisant passer plus immédiatement dans l'eau sous forme de sels alcalins solubles, l'acide citrique étant lui-même soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther.

II. — Précipitation argentique. — Extrait-pétrole acide et insaponifiable.

Extrait-éther-aqueux-acide brut (acides lipoïques, etc.) 0,0195

La solution éther correspondante à cet extrait a été, comme précédemment, lavée au citrate de sodium.

Extrait de pétrole acide provenant du précédent (acides lipoïques purs). 0,0190

Volumétrie stéarique : $(0{,}0066 \times 7{,}1) \times 0{,}40 = 0{,}0190$.

Extrait de pétrole insaponifiable (cholestérine) séché à 100 degrés. 0,0168

Il se présente sous la forme de belles houppes de cholestérine, parfaitement neutre à la phtaléine. Point de fusion : 145-147°.

EXPÉRIENCE 6

MÉTHODE KUMAGAWA-SUTO-SHIMIDZU ET GRIMBERT-LAUDAT

Cette expérience a pour objet de fortifier les données de l'expérience de même nom (expérience 3). Elle nous a paru utile puisque nous comparons les résultats obtenus par notre méthode aux résultats correspondants de la méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat et que, par conséquent, nous ne pouvons trop nous assurer de l'exactitude des nombres fournis par un procédé auquel nous mesurons le nôtre.

Tableau Résumé des Expériences 1, 2, 3, 4, 5, 6, du 5me Groupe.

EXTRAITS DU SÉRUM	MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT								MÉTHODE KUMAGAWA-SUTO				MÉTHODE GRIGAUT	
	EXPÉRIENCE 1		EXPÉRIENCE 4		EXPÉRIENCE 5		ACIDIMÉTRIE EN ACIDE STÉARIQUE		EXPÉRIENCE 3		EXPÉRIENCE 6		EXPÉRIENCE 2	
	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20 cc.	Pour 1000
Extrait-éther-absolu acétone (appareil Kumagawa-Suto)	0,0604	3,02	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Extrait-éther-absolu alcool (dº)	0,0034	0,17	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Extrait-éther-absolu total	0,0638	3,19	0,0854	4,27	0,0844	4,22	»	»	0,0354	1,77	0,0363	1,81	»	»
I. Saponification.														
Extrait-éther-aqueux acide (acides + insaponifiable). . .	0,0528	2,64	0,0588	2,94	0,0565	2,82	0,0298*	1,49*	»	»	»	»	»	»
Extrait-pétrole du précédent	»	»	0,0409	2,04	»	»	0,0201	1 »	0,0357	1,78	0,0370	1,85	»	»
II. Savons d'argent.														
Extrait-éther-aqueux acide	0,0280	1,40	0,0196	0,98	0,0195	0,97	»	»	»	»	»	»	»	»
Extrait pétrole du précédent (acides lipoïques)	0,0198	0,99	0,0191	0,95	0,0190	0,95	0,0210**	1,05**	0,0193	0,96	0,0196	0,98	»	»
III. Filtrat-alcool.														
Extrait-pétrole (insaponifiable). . .	0,0172	0,86	0,0176	0,88	0,0168	0,84	»	»	0,0164	0,82	0,0175	0,87	0,0162	0,81
Phosphomolybdate.	0,0225	1,12	0,0248	1,24	0,0248	1,24	»	»	0,0220	1,10	0,0211	1,05	»	»
Lécithine	0,0098	0,49	0,0108	0,54	0,0108	0,54	»	»	0,0096	0,48	0,0092	0,46	»	»

(*) et (**) Ces nombres se rapportent à l'expérience 1. Les autres nombres de la même colonne, à l'expérience 4.

De l'examen du tableau précédent on peut constater l'étroite similitude des nombres concernant la cholestérine, les acides lipoïques et la lécithine. On peut constater aussi l'inutilité d'une purification pétrolique précédant la précipitation argentique, la purification étant suffisante, après la précipitation.

On doit également noter (expérience 4) que la volumétrie stéarique de l'extrait de pétrole, 2,04 p. 1000 fournit un chiffre 1,00 p. 1000 représentant, à une approximation prévue, les acides lipoïques trouvés pondéralement, 0,95 p. 1000.

On peut faire une remarque identique sur les extraits-éther-aqueux acide avant et après la formation des savons d'argent : 1,49 à 1,40 p. 1000. Par cette volumétrie, il semble donc qu'on puisse évaluer approximativement la teneur du sérum en acides lipoïques.

Pareille observation s'applique aux expériences des groupes antérieurs. Malgré cela, nous ne saurions lui attribuer un rôle de substitution vis-à-vis du dosage pondéral, toujours nécessaire.

On pourrait maintenant s'étonner de constater un écart un peu fort entre la somme acides lipoïques + insaponifiable (0,95 + 0,88) = 1,83 et cette même somme 2,04 (expérience 4) trouvée directement avant passage par les savons d'argent. Elle s'explique parce que la première a subi un passage de plus au pétrole et que la seconde était encore légèrement jaunâtre, preuve de sa non pureté parfaite.

Une différence qui pourrait étonner plus justement, c'est celle qui existe entre les éthers-totaux 3,19 et 4,27 d'une part, et 4,22 d'autre part. Elle reconnaît, sans doute, sa raison dans la non identité des modes d'extraction, correspondants aux deux cas. Chose singulière d'ailleurs, c'est l'épuisement à l'acétone par l'appareil Kumagawa-Suto, dont le chiffre d'extrait-éther-absolu total est inférieur à ceux qu'on obtient, en se contentant de la simple précipitation acétonique.

EXPÉRIENCE 7

MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT MODIFIÉE

I. — Extraction acétone-alcool. — Saponification. Pas de reprise à l'éther après saponification.

20 centimètres cubes du même sérum sont précipités dans 200 centimètres cubes d'acétone.

On parvient par les voies connues au :

Poids de l'*extrait éther anhydre*. . . . . 0 gr. 0944

Après saponification, au lieu de distiller l'alcool, suivant la technique habituelle, nous voulions le filtrer, le neutraliser par CO^2 s'il était nécessaire, et précipiter directement par NO^3Ag, sans passer par l'extrait-éther acide. Cela n'a pas été fait, par oubli. Comme nous avions commencé à reprendre par l'eau chaude, nous n'avons pas continué la succession ordinaire de nos opérations en faisant intervenir l'éther, etc. Cette solution aqueuse a été évaporée jusqu'à siccité. Nous nous proposons de reprendre l'extrait sec par le pétrole, puis par l'alcool et NO^3Ag. Remarquons que si le pétrole dissolvait toute la cholestérine, on pourrait ensuite tout simplement reprendre par l'eau chaude, par un acide et l'éther, pour avoir les acides lipoïques, qu'il resterait ensuite à purifier.

Ayant effectivement repris par le pétrole, nous avons voulu filtrer sur un peu de coton afin de conserver ce coton pour le nettoyer à l'eau bouillante, mais la filtration a été impossible à cause du colmatage rapide. On a alors renoncé au pétrole, on l'a évaporé et on a repris par l'alcool bouillant qui passe très limpide sur papier.

Quant au filtre, sur lequel reste une matière d'un jaune brun, il est lavé à l'eau bouillante et le filtrat reçu dans une capsule. Il passe fortement coloré en jaune brun, ce qui est dû à ce que la matière brune se dissout, sauf une matière noirâtre, poussiéreuse, qui reste sur le filtre. On a évaporé à sec ce filtrat aqueux, dans l'intention de l'examiner et de le peser, ce qui n'a pas été fait par suite d'accident.

II. — Filtrat-alcool.

Lui ayant ajouté une goutte de phtaléine 1 p. 100, on ne constate pas de coloration. On fait donc intervenir directement NO^3Ag (2 cm³ 5) lequel donne un abondant précipité jaune ocre. Dans le filtrat clair on ajoute 3 centimètres cubes, NaOH alcool, on refiltre et évapore à siccité et à 50°, puis on traite par le pétrole, lequel laisse un résidu rouge (par suite de la présence de la phtaléine), insoluble, en passant lui-même incolore et absolument limpide. Ce résidu est entièrement soluble dans l'eau, que l'éther finit par surnager en laissant toutefois une émulsion et en la décolorant en partie. Après adjonction de SO^4H^2 dilué, l'émulsion est détruite. L'éther s'est coloré très légèrement et à la surface de séparation des deux liquides on observe un dépôt argentique.

L'éther est séparé et évaporé. Il laisse des acides gras souillés de deux ou trois taches argentiques. Le tout pèse : 0 gr. 0019. Ainsi, soit par défaut de quantité défectueusement mesurée, soit pour un autre motif, NO^3Ag a laissé passer un peu d'acides gras avec le filtrat-alcool insaponifiable.

Extrait de pétrole insaponifiable. — L'extrait de pétrole porté à 100° présente quelques taches liquides qui se solidifient en refroidissant. Ce phénomène ne s'observe pas avec les expériences précédentes.

Poids de l'extrait pétrole cholestérine . . . . 0 gr. 0191

Repris par le pétrole après un excès d'alcali et séchage 50/70°, il pèse . . . . . 0 gr. 0152.

L'extrait de pétrole 0.0191, dissous dans 10 centimètres cubes d'alcool pour être neutralisé par notre soude alcoolique, en exige 0,12 ; cela répond à : $(0{,}0066 \times 7{,}1) \times 0{,}12 = 0$ gr. 0056.

Cette acidité nouvelle d'une part, le point de fusion de l'autre (125°) nous interdisent de considérer l'insaponifiable obtenu comme pur. Il se pourrait que cette acidité secondaire assez élevée fut le résultat d'une dessiccation insuffisante.

III. — Traitement du précipité argentique.

Ce précipité abondant, lavé à l'éther anhydre, a dû entraîner non seulement les acides lipoïques, mais encore diverses

substances azotées ou non. Sa dissolution dans l'eau azotique et l'éther donne lieu à une solution éther fortement colorée en jaune brun et à un dépôt AgO ou Ag assez abondant, dérivant sans doute d'une réduction notable, due à l'abondance et à la nature des impuretés.

On lave l'éther à l'eau comme d'habitude, mais l'éther retient néanmoins en suspension d'assez fortes quantités d'AgO. Pour finir, on lave cet éther avec une solution de citrate de soude (quelques petits fragments dans 1/2 tube à essai d'eau (*). Aussitôt il s'éclaircit et laisse déposer son AgO. L'eau de lavage est absolument neutre. On a néanmoins l'impression que la solution éther contient encore en suspension de fines particules d'AgO, ce qui est confirmé par l'extrait sec où on les perçoit nettement et mieux encore, quand on reprend cet extrait, séché à 50°, au moyen du pétrole, lequel abandonne ces particules et passe incolore et absolument limpide. On en déduit l'*extrait-pétrole* suivant : 0 gr. 0143. Cet extrait a l'aspect pâteux, fond vers 26-27°, et attaque le cuivre. Son aspect nous fait douter de sa pureté. L'acidimétrie nous confirme dans ce doute, puisque nous trouvons seulement 0,0103 en acide stéarique.

Les acidités résiduelles manquantes sont restées attachées notamment, nous l'avons vu, à l'extrait de pétrole d'insaponifiable. En somme, les pertes portant à la fois sur l'insaponifiable et les acides gras résultent, pensons-nous, des innovations que nous avons voulu essayer et qui, par conséquent, doivent être rejetées.

(*) Nous justifierons par la suite cette intervention du citrate de soude.

Tableau résumé de l'expérience n° 7.

EXTRAITS DU SÉRUM	MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT MODIFIÉE		ACIDIMÉTRIE EN ACIDE STÉARIQUE	
	Pour 20 cc.	Pour 1000	Pour 20cc.	Pour 1000
Extrait-éther-absolu. . . .	0,0944	4,72	»	»
Extrait-éther aqueux acide.	»	»	»	»
Extrait-pétrole aqueux-acide.	0,0143	0,71	0,0103	0,51
Filtrat-alcool : Extrait-pétrole	0,0191	0,95	»	»
Extrait pétrole (reprise). .	0,0152	0,76	»	»
Acidité résiduelle en acide stéarique.	»	»	0,0056	0,28
Acidité résiduelle abandonnée par le filtrat-alcool	0,0019	0,09	»	»
Acidité totale, stéarique et éthérique : 0,51 + 0,28 + 0,09	»	»	»	0,88

En raison de son unicité, l'expérience 7 ne saurait donner lieu à des déductions catégoriques. Toutefois, elle est instructive parce qu'elle montre que la moindre faute opératoire ou la plus petite dérogation à une technique bien établie, peut entraîner des erreurs sérieuses sur la quantité et la pureté des corps dont on a le dosage en vue. Il sera toujours intéressant, notamment, de s'assurer de la neutralité de la cholestérine, aussi bien par l'application de la méthode acétone-savons d'argent que par l'application de la méthode Kumagawa-Suto.

En additionnant les acidités stéariques volumétriques et l'extrait-éther-acide 0,09, nous arrivons seulement à faire 0,88 d'acidité totale, soit un déficit notable sur nos cinq expériences concordantes antérieures. La perte en insaponifiable est également sérieuse.

Nous n'avons pu recommencer cette expérience en la dirigeant conformément à nos premières visées, c'est-à-dire intervention directe de NO^3Ag sur le filtrat-alcool issu de la

saponification, et en laissant de côté l'extraction éthérée des acides gras. Dans ce cas, il est vraisemblable que le phosphore, à l'état de sel phosphoré alcalin, aurait été précipité sous forme de sel d'argent, tout comme les acides lipoïques. Nous pensions pouvoir le doser dans la liqueur nitrique consécutive à la décomposition des sels argentiques. En somme, nous espérions dériver le dosage de la lécithine de cette seconde liqueur nitrique, au lieu de le déduire de la première liqueur de même nom, comme il est fait, en respectant la conduite de la technique habituelle. Cette initiative nous exemptait d'un lavage à l'éther, au cas où l'expérience l'aurait justifiée.

De toutes manières, elle ne pouvait nous engager à nous dispenser de la saponification, en essayant l'action de NO^3 Ag-alcool successivement, en remontant, sur l'extrait-éther absolu, où ce sel est insoluble, ensuite sur la solution-alcool.

En effet, (nous l'avons vérifié) NO^3 Ag ne donne rien dans ces circonstances, ni avec les lipoïnes neutres, ni avec les acides lipoïques libres sur lesquels il intervient toutefois lentement et d'une façon complexe. Enfin il ne donne rien non plus sur la *solution acétone* où les résultats sont les mêmes, et avec laquelle, cependant, la solution NOAg-alcool est parfaitement miscible. Néanmoins, on ne peut prétendre que, de ces observations, ne puisse s'élaborer le moyen de doser séparément, dans un mélange, les acides libres, salifiés, puis les acides éthérifiés, après leur saponification.

Tableau résumé des 5 Groupes d'Expériences faisant l'objet du Chapitre III.

SÉRUMS	EXTRAIT-ÉTHER ABSOLU		EXTRAIT PÉTROLE ACIDE (ACIDES GRAS)		ACIDIMÉTRIE EN ACIDE STÉARIQUE		EXTRAIT PÉTROLE INSAPONIFIABLE		LÉCITHINE		INSAPONIFIABLE MÉTHODE GRIGAUT	
		Pour 1000		Pour 1000		Pour 1000		Pour 1000		Pour 1000		Pour 1000
Groupe I												
1 (30 cc.)	0,1528	5,09	0,0879	2,93	0,0927	3,09	0,0480	1,60	0,0355	1,18	»	»
2 »	»	»	»	»	»	»	0,1058	3,52	0,0345	1,15	»	»
3 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	0.0494	1,64
4 »	»	»	»	»	»	»	0,0413	1,37	»	»	»	»
Groupe II												
1 (40 cc.)	0,1897	4,74	0,0682	1,70	0,0708	1,77	0,0435	1,08	0,0480	1,20	»	»
2 (20 cc.)	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	0,0180	0,90
Groupe III												
1 (30 cc.)	0,1225	4,08	0,0736	2,45	0,0738	2,46	0,0360	1,20	»	»	»	»
2 (20 cc.)	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	0,0248	1,24
3 »	0,0606	3,03	0,0265 (par différence)	1,32	»	»	0,0274	1,37	»	»	»	»
Groupe IV (neutralisation exacte)												
1 (20 cc.)	»	»	0,0162	0,81	»	»	0,0130	0,65	0,0284	1,42	»	»
2 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	0,0130	0,65
3 »	0,0382	1,91	0,0276	1,38	»	»	0,0124	0,62	0,0290	1,45	»	»
Groupe V (neutralisation exacte)												
1 (20 cc.)	0,0638	3,19	0,0198	0,99	0,0210	1,05	0,0172	0,86	0,0098	0,49	»	»
4 »	0,0854	4,27	0,0191	0,95	»	»	0,0176	0,88	0,0108	0,54	»	»
5 »	0,0844	4,22	0,0190	0,95	»	»	0,0168	0,84	0,0108	0,54	»	»
Moyennes . .	0,0778	3,89	0,0193	0,96	»	»	0,0172	0,86	0,0104	0,52	»	»
3 (20 cc.)	0,0354	1,77	0,0193 (par différence)	0,96	»	»	0,0164	0,82	0,0096	0,48	»	»
6 »	0,0363	1,81	0,0196	0,98	»	»	0,0175	0,87	0.0092	0,46	»	»
Moyennes . .	0,0358	1,79	0,0194	0,97	»	»	0,0169	0,84	0,0094	0,47	»	»
2 (20 cc.)	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	0,0162	0,81

Nous résumons toutes nos expirences du chapitre III, dans le tableau ci-contre, que nous faisons suivre, succinctement, d'indications sur les

MÉTHODES EMPLOYÉES

Groupe I

Expérience 1. — Méthode acétone-savons d'argent.

1° Extraction à l'acétone. Elimination de l'acétone et, sur la solution aqueuse restante, formation de l'extrait-éther absolu.

2° Extraction à l'alcool, dont on fait l'extrait-éther absolu.

3° Saponification des deux extraits-éther absolu mélangés.

4° Continuation de la méthode acétone-savons d'argent.

Expérience 2. — Méthode acétone-savons d'argent avec cholestérine artificiellement ajoutée.

Expérience 3. — Méthode de saponification directe de Grigault.

Expérience 4. — Méthode de Grigaut modifiée.

Groupe II

Expérience I. — Comme expérience 1, Groupe I, sauf modification portant sur l'extraction acétonique, voir page 204.

Expérience 2. — Comme expérience 3, du Groupe I.

Groupe III.

Expérience 1. — Comme expérience 1, Groupe 1.

Expérience 2. — Comme expérience 3, Groupe I.

Expérience 3. — Méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat.

Groupe IV.

Expérience 1. — Méthode acétone-savons d'argent.

1° Extraction à l'acétone. Extrait obtenu par dessiccation complète à l'étuve à 50°. Traitement de cet extrait par l'alcool bouillant.

2° Extraction à l'alcool. Solution alcoolique jointe à la précédente.

3° Saponification directe des deux solutions alcooliques précédentes mélangées.

4° L'extrait-éther acide obtenu est repris par le pétrole pour en faire un extrait-pétrole acide conformément à la méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat.

5° Continuation de la méthode acétone-savons d'argent combinée avec certains artifices expérimentaux destinés à corriger l'application défectueuse de la méthode, artifices n'ayant d'ailleurs pas donné de bons résultats.

Expérience 2. — Comme expérience 3, Groupe I.

Expérience 3. — Comme expérience 3, Groupe III.

Groupe V

Expérience 1.

1° Extraction à l'acétone par l'appareil Kumagawa-Suto, dont on fait l'extrait-éther absolu.

2° Extraction à l'alcool (appareil Kumagawa-Suto) dont on fait l'extrait-éther absolu.

3° Saponification des deux extraits éther absolu précédents mélangés.

4° Continuation de la méthode acétone-savons d'argent.

Expérience 2. — Comme expérience 3, Groupe I.

Expérience 3. — Comme expérience 3, Groupe III.

Expérience 4.

1° Extraction à l'acétone dont on fait l'extrait-éther absolu.

2° Extraction à l'alcool dont l'extrait est repris par l'éther absolu.

3° Saponification du mélange des deux extraits-éther précédents.

4° L'extrait-éther acide obtenu est repris par le pétrole pour en faire un extrait-pétrole acide conformément à la méthode Kuma-

gawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat.

5° Continuation de la méthode acétone-savons d'argent.

Expérience 5.

1° Extraction à l'acétone dont on fait l'extrait-éther absolu.

2° Extraction à l'alcool dont on fait l'extrait éther absolu.

3° Saponification des deux extraits-éther précédents mélangés.

4° Reprise par l'eau chaude dont on fait l'extrait sec.

5° Reprise par le pétrole dont on fait l'extrait sec.

6° Reprise par l'alcool bouillant.

7° Continuation de la méthode acétone-savons d'argent sur le filtrat-alcool précédent.

Expérience 6. — Comme expérience 3, Groupe III.

Les expériences des cinq groupes du tableau de la page 245 ne nous laissent aucun doute sur la parfaite validité de notre méthode concernant le dosage des lipoïdes, c'est-à-dire la lécithine et la cholestérine. Le 5e seul nous autorise à penser de même en ce qui concerne le dosage des acides lipoïques, mais il est suffisant pour entraîner notre conviction sur ce point.

Si nous examinons de près les opérations de ce groupe, nous sommes d'abord frappés de ce fait que l'extrait sec éther-aqueux-acide en solution alcoolique est exactement neutralisé, que la solution-alcool insaponifiable ne reçoit pas non plus un excès d'alcali. La phtaléine est un guide sûr et pratique, insoluble dans l'éther de pétrole, avantage déjà reconnu par Kumagawa et Suto.

La solution de citrate de soude pour laver les solutions éther-lipoïques paraît un auxiliaire précieux. A ce sujet et au sujet de la dessiccation des extraits, nous avons fait des expériences intéressantes décrites Chapitre IV page 253. Au reste, ces expériences étaient superflues pour prouver l'utilité du citrate de soude et de la siccité complète, déjà

démontrées par l'ensemble des résultats comparatifs de nos analyses.

Tous les extraits, en effet, nous y insistons, doivent être absolument secs et mis en réaction, seulement quand leur poids ne varie plus. L'étuve de dessiccation doit être réglée à une température uniforme de 50 ou de 100°, suivant qu'on a affaire à des mélanges lipoïques ou insaponifiables.

Les variations apportées aux modes de récupération de l'extrait-éther-absolu total sur l'extraction acétone-alcool paraissent influencer la valeur pondérale de cet extrait-éthéré, mais non la quantité totale des liposes qu'il doit contenir. Cela seul importe aux résultats finals. A ce propos, résumons ici, en partant de l'extraction acétone-alcool, les modes de formation de l'extrait-éther absolu total auxquels nous faisons allusion :

Extraction. — Le sang ou le sérum sont précipités dans un volume 10 fois plus considérable d'acétone. On filtre dès que le précipité s'est rassemblé (10 ou 15 minutes). On peut alors choisir entre les opérations suivantes :

1° La solution acétone est distillée, si l'on veut récupérer l'acétone isolément ou ne pas attendre l'extraction alcoolique, sinon on lui mélange la solution-alcool provenant de cette extraction et on distille les deux solvants simultanément, d'où l'on fait un *extrait-sec-acétone-alcool.*

Quand on n'opère pas ce mélange, les alternatives que voici se présentent :

A. Chasser l'acétone jusqu'à obtention d'une solution aqueuse : *extrait-aqueux-acétone*, qu'on peut :

a) Soit achever de sécher complètement : *extrait-sec-acétone* :

α) A son tour repris, si l'on veut, par la solution alcool dont on fait, après épuisement, l'*extrait-sec-acétone-alcool.*

b) Soit épuiser par l'éther quand celui-ci la rend absolument limpide : *solution éther-aqueux-acétone*, dont on fait l'*extrait sec-éther-aqueux-acétone* :

α) A son tour repris, si l'on veut, par la solution-alcool dont on fait l'*extrait-sec-éther-aqueux-acétone-alcool.*

c) Soit mélanger à la solution-alcool provenant de l'extraction alcoolique et distiller le mélange dont on fait l'*extrait-sec-acétone-alcool.*

Bien entendu, il faut adopter généralement la plus courte et la plus pratique de ces variétés. On la trouvera à la fin de cet ouvrage, dans nos conclusions, où nous schématisons notre technique sous la forme que nous avons définitivement adoptée en l'appliquant aux analyses de sang humain.

Remarque. — En combinant la méthode Windaus à notre méthode, comme l'ont fait Mayer et Schaeffer à la méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu, c'est-à-dire en précipitant la cholestérine libre, par la digitonine, dans une solution-alcool absolu précédant la saponification, il y a tout lieu d'admettre qu'on pourrait ainsi doser cette fraction de cholestérine au cours de l'application de notre méthode, puis, en la poussant jusqu'au bout, la cholestérine combinée, et par suite la cholestérine totale. Cependant nous n'avons fait aucune expérience à cet égard.

La méthode Windaus est, sans contredit, également applicable à la cholestérine contenue dans la solution-alcool provenant de la filtration des savons d'argent.

Ainsi cette méthode peut exactement se combiner à la nôtre, comme Mayer et Schæffer l'ont associée à celle de Kumagawa et Suto.

Rapports de la cholestérine, des acides lipoïques et de leurs sommes à 100 parties de l'extrait-éther absolu correspondant.

SÉRUMS 1000	INSAPONIFIABLE	ACIDES	INSAPONIFIABLE + ACIDES	EXTRAIT-ÉTHER ABSOLU	RAPPORTS A 100		
					INSAPONIFIABLE	ACIDES	INSAPONIFIABLE + ACIDES
Groupe I							
1	1,60	2,93	4,53	5,09	31,43	57,56	88,99
Groupe II							
1	1,08	1,70	2,78	4,74	22,78	35,86	58,64
Groupe III							
1	1,20	2,45	3,65	4,08	29,41	60,04	89,45
3	1,37	1,32	2,69	3,03	45,21	43,56	88,77
Groupe IV (neutralisation exacte)							
1	0,65	0,81	1,46	»	»	»	»
3	0,62	1,38	2,00	1,91	32,46	72,25	104,71
Groupe V							
1	0,86	0,99	1,85	3,19	26,95	31,03	57,98
4	0,88	0,95	1,83	4,27	20,60	22,24	42,84
5	0,84	0,95	1,79	4,22	19,90	22,51	42,41
3	0,82	0,96	1,78	1,77	46,32	54,23	100,55
6	0,87	0,98	1,85	1,81	48,06	54,14	102,20

On voit, d'après ce tableau, que le rapport de la somme acides lipoïques + insaponifiable est sensiblement égal à l'unité dans le cas de la méthode de Kumagawa-Suto-Schimidzu et environ à la moitié dans le cas de la méthode acétone-savons d'argent. La différence comporte des impuretés dues à l'extraction acétonique. Elle s'effacerait et le rapport se releverait à 1 si, l'acétone étant supprimé, la *méthode savons d'argent* seule était mise en œuvre ; mais sans rien gagner à cette suppression, puisque nous savons éliminer les impuretés, on y perdrait les avantages de l'extraction acétonique.

Notons que l'extrait-éther-absolu-acétone vaut les 90 à 95 p. 100 de l'extrait-éther absolu total. On voit combien le travail d'extraction de l'alcool est réduit de ce chef. Dans nos deux dernières expériences sur le sang humain, nous nous contentions de l'exercer pendant 3 heures seulement, au lieu de 5 heures. Peut-être une durée encore moindre serait-elle suffisante, mais nous ne nous en sommes pas assuré.

Expérience indépendante sur le sang total du cheval.

Prise d'essai : 26 gr. 055.

Précipitée dans 260 centimètres cubes d'acétone. On a filtré seulement le lendemain. L'acétone, qui la veille était jaune d'or, est à peu près décoloré, phénomène que présente également l'alcool. On lave le précipité rouge abondant avec encore une certaine quantité d'acétone. On refiltre et l'on fait tomber le filtratum sur une cartouche filtrante contenue dans un appareil Kumagawa et Suto où l'on épuise à l'acétone pendant 8 heures. Après s'être assuré que quelques gouttes de cet acétone, tombant du siphon dans un verre de montre, ne laisse plus trace de résidu à l'évaporation, on évapore le filtrat acétonique au bain-marie et on continue l'épuisement du précipité avec l'alcool qui est naturellement mélangé de l'acétone imprégnant le précipité. Mais ce dernier épuisement ne paraît pas en finir, car après plus de 8 heures il passe encore jaune orangé et l'on s'aperçoit que la solution est d'un rouge noir, tandis que le précipité paraît en partie décoloré. Évidemment il y a là une destruction ou un enlèvement de l'oxyhémoglobine. Est-elle due à l'action de l'alcool ou de

son mélange avec un peu d'acétone? Dans tous les cas, nous n'avons noté ce fait qu'avec l'expérience présente et l'appareil Kumagawa et Suto.

Les deux solutions acétonique et alcoolique sont évaporées chacune de leur côté, séchées à 50°, reprises par l'éther anhydre. Ce dernier ne paraît pas dissoudre la matière noirâtre (cette matière noirâtre, épuisée par l'éther, est presque entièrement soluble dans l'eau en la colorant en jaune ambré plus ou moins foncé), provenant de l'oxyhémoglobine, mais il a sûrement dissous quelque chose, étant donnée sa couleur ambrée. Pour le sang total, aussi bien que pour le sérum, l'acétone est impuissant à l'épuiser de ses matières grasses, même après l'avoir privé de son eau. L'alcool paraît donc bien indispensable, au moins aux températures auxquelles on opère, confirmation d'un fait démontré, comme on sait, par Kumagawa et Suto pour les tissus musculaires desséchés.

Extrait éther-acétone (anhydre).	0.0889
Extrait éther-acétone (portion aqueuse).	0.0203
Extrait total	0.1092

Un accident ne permet pas de poursuivre ces opérations. Nous n'avons pu les recommencer, mais nous reprendrons les analyses de sang total à propos du sang humain.

Nous avons tenu à faire mention de l'expérience présente uniquement en raison de l'action particulière de l'alcool notée au début et que nous n'avons plus observée avec le sang humain.

Cette action aurait mérité peut-être un examen spécial que nous n'avons pas fait.

CHAPITRE IV

I — JUSTIFICATION EXPÉRIMENTALE DE L'EMPLOI DU CITRATE DE SOUDE DANS LA PURIFICATION DES ACIDES LIPOIQUES.

§ 1. — Action du citrate de soude sur l'acide lactique.

Kumagawa et Suto ont démontré que l'acide lactique souille constamment les extraits éthérés lipoïques, des tissus musculaires. Nous étendrons cette proposition aux *extraits-éthers* du sang.

L'emploi du citrate de soude dans notre procédé de dosage des hémoliposes présenterait donc un intérêt certain, s'il neutralisait l'acide lactique en même temps que les autres acides au moment du lavage des éthers d'épuisement mis en œuvre pour épuiser les solutions de leurs acides lipoïques. Pour le savoir, nous dissoudrons une quantité connue d'acide lactique dans une quantité connue d'eau.

Nous en prendrons une partie aliquote, en doserons l'acidité par NaOH titré et phtaléine.

Une partie aliquote égale est traitée par deux fois son volume d'éther. L'éther est séparé, évaporé en présence d'eau et le dosage est recommencé par NaOH.

Une 3e partie aliquote est soumise au traitement précédent avec cette différence que l'éther, avant d'être évaporé, est lavé au moyen d'une solution de citrade de soude.

Essai 1. — III gouttes d'acide lactique pur sont mélangées à 50 centimètres cubes H^2O; 10 centimètres cubes de cette solution sont titrés par Na OH N/10, ce qui donne XVI gouttes, soit 1 cent. cube 1, ou en poids :

$$\left(\frac{CH^3(CHOH)COOH}{NaOH} = \frac{90}{40} = \frac{\text{acide lactique}}{0{,}00404} = 2{,}2500\right)$$

d'où acide lactique = $2{,}2500 \times 0{,}00404 = 0{,}0091$.

Essai 2. — La liqueur lactique-aqueuse est épuisée simplement deux fois par l'éther. La première fois, elle est nettement acide au papier de tournesol. Il en est de même pour la seconde fois, ce qui prouve que l'acide lactique ne paraît pas passer facilement dans l'éther. Elle est ensuite débarrassée de ce dernier par une évaporation suffisante au bain-marie. La titration de l'eau restante demande 0 cent. cube 9 Na OH N/10, soit XIV gouttes ou 0 cent. cube 96 de la pipette employée. Virage très net comme précédemment, correspondant à un poids d'acide lactique = à 0,0085. L'éther a donc enlevé à la liqueur aqueuse lactique $0{,}0091 - 0{,}0085 = 0{,}0006$, c'est-à-dire 6,59 p. 100 de son acide lactique.

Essai 3. — 10 centimètres cubes de la même solution sont épuisés dans une ampoule à séparation, par de l'éther. L'éther est lavé d'abord au moyen d'une solution de citrate de soude (10 centimètres cubes environ), assez concentrée, ensuite à trois ou quatre reprises par H^2O.

Le citrate de soude en solution est alcalin au papier de tournesol. Cherchons à voir comment va se comporter le citrate de lavage avec NaOH N/10 et la phtaléine. Il exige 0 cent. cube 4, soit V gouttes environ, pour arriver à un rouge auquel il ne parvient que progressivement en passant par un rose pâle et plus vif. On a donc, avec les XIV gouttes exigées par la liqueur aqueuse épuisée à l'éther, 1 cent. cube 3 au total, ou XIX gouttes.

Le peu de netteté du virage ne nous permet pas de tirer grande confiance sur ce nombre qui, dans tous les cas, est un maxima.

Mais ce qui est beaucoup plus intéressant à notre point de vue spécial, c'est l'éther lavé au citrate de soude, puis à l'eau, dont nous faisons l'extrait sec ci-après.

Cet extrait, très faible, paraît solide. Il pèse 0,0003.

Quelle est la nature de cet extrait? Est-ce de l'acide citrique ou du citrate de soude? On en doit douter parce que ces corps sont classiquement insolubles dans l'éther. Mais peut-être le sont-ils un peu dans l'éther-aqueux.

Quoi qu'il en soit, le résidu très faible n'est plus soluble ni dans l'éther absolu, ni dans l'éther de pétrole.

Il résulte de ces faits, que l'emploi du citrate de soude comme neutralisateur des acides autres que les acides lipoïques — acides minéraux, acide lactique — est tout à fait recommandable pour en débarrasser les solutions éthérées.

Nous allons constater, en effet, qu'il n'a pas d'influence sur l'acide stéarique. Ces vérifications, au surplus, constituent une pure satisfaction de l'esprit, puisque nos contrôles antérieurs auraient pu nous dispenser de les faire.

§ 2. — Action négative du citrate de soude sur l'acide stéarique.

L'acide stéarique fera les frais des expériences suivantes :

Prise d'essai : 0 gr. 0152.

Dissous dans 10 centimètres cubes d'alcool et titré avec NaOH alcoolique (à 0,0066 par centimètre cube) = 0 cent. cube 32, soit en acide stéarique : $0{,}0066 \times 7{,}1000 \times 0{,}32 = 0{,}01499$.

La neutralisation ainsi faite, l'alcool est évaporé à siccité. L'extrait est repris par l'eau chaude, acide sulfurique et azotique dilués, puis par l'éther. L'éther est d'abord lavé au citrate de soude, ensuite deux fois à l'eau, évaporé, séché à 50° et pesé.

On le reprend par 10 centimètres cubes alcool et on retitre par NaOH alcoolique : 0 cent. cube 32 (chiffre identique au précédent).

Cette expérience a été faite dans le but de déterminer si le citrate de soude avait une action perturbatrice. On peut constater qu'il n'en est rien.

II. — DÉMONSTRATION DE L'IMPORTANCE DE LA DESSICCATION COMPLÈTE DES MÉLANGES LIPOIQUE ET CHOLESTÉRIQUE QUAND IL S'AGIT DE PURIFIER LES ACIDES LIPOIQUES ET LA CHOLESTÉRINE PAR L'ÉTHER DE PÉTROLE.

Expérience 1. — Cet acide stéarique d'épreuve précédent, ainsi neutralisé, est sursaturé par un excès de soude alcoo-

lique et séché à l'étuve 50-80°, puis repris par le pétrole. Ce dernier, filtré et évaporé, laisse un résidu très notable, blanc, qui est, soit de l'acide stéarique provenant de la dissociation du savon alcalin, soit du savon alcalin lui-même.

Ce résidu, repris par l'eau, est bien soluble en rouge vif. Chauffé au bain-marie, il se trouble un peu, en même temps que sa teinte diminue beaucoup. Traité par SO^4H^2 dilué, il se trouble considérablement. Si on agite avec l'éther, le trouble disparaît immédiatement. Il était évidemment déterminé par l'acide stéarique.

L'extrait de pétrole sec pèse : 0,0029. Point de fusion : entre 105 et 110°. Si l'on cherche à titrer ces 0,0029 de substance, 1 seule goutte de soude suffit à colorer en rose et cette goutte correspond d'ailleurs à 0,0009 d'acide stéarique, chiffre très inférieur au poids trouvé. On est donc obligé de conclure qu'il s'agit non pas d'acide stéarique, mais très probablement d'un savon dont la solubilité, assurément faible dans le pétrole, trouve son explication dans la présence de traces d'alcool non entièrement éliminé par un séchage imparfait. Ce séchage offre donc un intérêt de tout premier ordre, comme nous le savons déjà, quand il s'agit d'écarter, au moyen du pétrole, certaines impuretés.

Expérience 2. — Prise d'essai séchée à 50° jusqu'à poids constant . . . . . 0 gr. 0184

Traité par l'éther de pétrole, l'acide, qui a subi un commencement de fusion, est assez difficile ou plutôt long à dissoudre, mais il l'est complètement. On laisse évaporer à sec, reprend par 10 centimètres cubes alcool et titre.

Avant la reprise par l'alcool, on avait pesé l'acide séché à 50-80°. *Le poids n'avait pas changé.* Par conséquent, non seulement l'acide n'a pas été altéré, mais le pétrole l'avait dissous entièrement, ainsi qu'on avait déjà pu en conclure par l'apparence limpide de la solution.

L'acidimétrie donne 0 cent. cube 4, soit en acide stéarique $(0{,}0066 \times 7{,}1) \times 0{,}4 = 0{,}0187$.

Ainsi neutralisé, l'alcool est évaporé et le résidu porté à l'étuve 50-80° et pesé.

Poids du stéarate sodique trouvé. . . . . 0 gr. 0216

Or, 1 centimètre cube de soude alcoolique équivaut à 0,0066 de soude NaOH, donc 0 cent. cube 4 = 0,0066 × 0,4 = 0,00264 de soude qui, ajoutée à l'acide stéarique auquel elle s'est combinée, donne 0,00264 + 0,0184 = 0,02104 de stéarate sodique.

Si, d'autre part, nous calculons le stéarate sodique anhydre $C^{17}H^{35}CO^2Na$ correspondant à 0,0184 d'acide stéarique, nous trouvons :

$$\frac{\text{Stéarate}}{\text{Acide stéarique}} = \frac{306}{284} = 1.077 = \frac{\text{Stéarate}}{0{,}0184} ;$$

Stéarate calculé = 1,077 × 0,0184 = 0,01981

Si l'on porte le stéarate précédent à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, on obtient le stéarate anhydre 0,0204 en accord parfait avec le stéarate calculé. Ce stéarate parfaitement anhydre est repris à l'éther de pétrole. Celui-ci, évaporé, laisse seulement un résidu de 0,0001.

Ce résultat confirme nos appréciations à propos de l'expérience 1, touchant la nécessité de dessécher soigneusement tout mélange dont on veut extraire, par le pétrole, une ou plusieurs substances définies, à l'état pur.

Ici nous avions affaire à un savon non seulement sec mais exactement neutre. Dans l'expérience 1, il s'agissait d'un savon avec un excès d'alcali. On sait avec quelle rapidité ce dernier, quand il est primitivement sec, attire l'humidité de l'atmosphère. Il convient donc, quand on veut épuiser, par le pétrole, un tel mélange, offrant un excès d'alcali, de se méfier particulièrement de cette humidité en s'entourant des précautions indispensables, notamment en faisant agir le pétrole sur la substance encore chaude.

Quand on le pourra, l'expérience précédente montre qu'il vaudra mieux s'en tenir à une neutralisation exacte, d'où l'intérêt double résultant de l'emploi de phtaléine, à la fois indicatrice de la neutralité et insoluble dans l'éther de pétrole.

CHAPITRE V

APPLICATION DE LA MÉTHODE ACÉTONE-SAVONS D'ARGENT AU SANG HUMAIN

En possession d'une méthode dont la technique opératoire est bien établie, grâce aux expériences exécutées avec le sérum du sang de cheval, nous allons appliquer cette même méthode au sérum humain et nous l'étendrons au sang total. Nous vérifierons ses résultats en continuant à la comparer à la méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat, négligeant cette fois d'autres vérifications devenues inutiles.

Dans l'application de la méthode acétone-savons d'argent au sang humain, on peut faire les observations générales déjà constatées à propos du sang de cheval. Les précipités protéiques et les solutions acétoniques ont des apparences absolument communes; les évaporations dans le vide ou à l'air libre, donnent lieu aux mêmes phénomènes généraux et nous pouvons noter les mêmes avantages en ce qui concerne l'emploi de l'acétone. Le nitrate d'argent fournit des précipités dont le traitement ne diffère en rien des précipités correspondants du sang des équidés.

Nous nous bornerons donc à décrire, très succintement, l'analyse suivante, parce qu'elle se distingue par la détermination séparée, en deux fractions composantes, de l'extrait-éther-aqueux acide total, et nous terminerons en résumant les résultats de toutes les autres analyses, en des tableaux comparatifs.

Dans nos premières analyses sur le sang humain, nous avons dosé seulement les lipoïdes. Ces analyses ont d'ailleurs précédé, en réalité, nos études sur le sang de cheval. C'est sur ce dernier que nous avons précisé notre technique,

relative aux acides lipoïques, et l'avons ensuite appliquée à de nouvelles analyses de sang humain.

Dosage des lipoïdes du sérum sanguin d'un homme de 26 ans, atteint de néphrite chronique avec lésion rétinienne droite.

Sérum lactescent. Poids du sérum traité 25 gr. 183			
Extrait-éther absolu acétone	0,1867	soit 7,41	p. 1000
Extrait-alcool	0,0416	— 1,65	—
Extrait-éther absolu alcool.	0,0231	— 0,91	—
Extrait-éther absolu total	0,2098	— 8,32	—

Le traitement de l'extrait-alcool par l'éther laisse une substance blanche d'apparence sableuse, composée en majeure partie, comme chez le cheval, de chlorure de sodium, mais ne contenant pas de phosphore et mélangée d'une petite quantité de matières organiques.

On reprend par environ 50 centimètres cubes d'alcool additionné de 1 gr. 50 environ de potasse caustique par 0 gr. 20 d'extrait éthéré. Le tout est porté au réfrigérant ascendant 4 heures. L'alcool est distillé. On le remplace par 25 ou 30 centimètres cubes d'eau et deux fois plus d'éther. Une ampoule en permet la séparation après agitation. On traite deux fois par l'éther. Celui-ci est lavé à la manière ordinaire et évaporé. Il laisse un résidu cristallisé en aiguilles divergentes autour d'un centre, qui est séché à 50° jusqu'à poids constant, lequel est de :

Extrait-éther-aqueux basique après saponification : 0,0976 soit 3,87 p. 1000.

La portion aqueuse traitée par l'éther précédent est reprise par une nouvelle quantité d'éther avec adjonction de NO^3H dilué. La liqueur se trouble et de foncée qu'elle était s'éclaircit aux deux sens du mot.

Le poids du second extrait éthéré ainsi obtenu est de 0,0602, soit 2,39 p. 1000.

Dans ce dernier, on ne distingue aucune cristallisation, mais une masse qui paraît uniformément grasse. Le poids total est :

Extrait-éther aqueux acide. . . . . 0,1578.

Comme on le voit, nous avons exécuté ici en deux temps ce que nous faisons ordinairement en un seul, afin de nous rendre compte du rapport qui pouvait exister entre les deux extraits éthérés.

La cristallisation apparente du premier, nous démontre la présence prépondérante de la cholestérine, mais baignée d'un liquide d'aspect huileux de nature évidemment grasse. Nous constatons ainsi, une fois de plus, l'impuissance des solutions aqueuses alcalines à débarrasser, au moins du premier coup, l'éther de ses acides gras.

L'analyse poursuivie sur l'*extrait-éther-aqueux acide total* obtenu précédemment en respectant les tractations de notre *modus operandi*, nous donne en définitive les résultats suivants :

Pour l'*extrait-éther-pétrole*, insaponifiable : 0.0611 soit 2,43 p. 1000.

Le phosphore, dosé comme d'habitude sur la première liqueur aqueuse nitrique, nous fournit un poids de phosphomolybdate d'ammonium = à 0,0707, d'où lécithine distéarocholinique correspondante :

$$\left(\frac{0{,}0707}{2{,}3} = 0{,}0307\right) \times \frac{1000}{25{,}183} = 1{,}21 \text{ p. } 1000.$$

Les mêmes dosages, répétés d'après Kumagawa-Suto-Shimidzu sur 25 gr. 808 de sérum nous fournissent un :

Extrait-éther de pétrole insaponifiable (cholestérine) = à 0,0645 soit 2,50 p. 1000.

Le phosphomolybdate correspondant à la lécithine est = à 0,0752 d'où l'on déduit comme lécithine :

$$\left(\frac{0{,}0752}{2{,}3} = 0{,}0327\right) \times \frac{1000}{25{,}808} = 1{,}27 \text{ p. } 1000$$

Nous pensons qu'il est inutile, désormais, d'entrer dans le détail de nos autres dosages, que nous nous contenterons de rassembler dans le tableau suivant.

La technique suivie a été celle que nous avons adoptée à la suite de nos dernières expériences (Groupe V) sur le sang du cheval.

Nous avons fait usage aussi du citrate de sodium. Ce sel

n'est pas indispensable, mais il permet un lavage plus rapide et facile, tout en restant aussi sûr, des solutions éther d'acides lipoïques. Il neutralise et écarte, de ces solutions éthérées, les acides minéraux et certains acides organiques tel que l'acide l'actique, tout en respectant les acides lipoïques.

On a opéré seulement sur 10 centimètres cubes de sérum et respectivement 10 gr. 630 de sang total Méthode acétone savons d'argent et 11 gr. 123 (Méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat).

Sur 1000 de sang ou de sérum humain (néphrites diverses).

	SANG TOTAL		SÉRUM					
	Acétone	Alcool	Acétone	Alcool	Acétone	Alcool	Acétone	Alcool
	—	—	—	—	—	—	—	—
Lécithine. . .	2,37	2,30	1,21	1,27	1,05	1,00	2,24	2,19
Cholestérine .	2,70	2,76	2,43	2,50	1,82	1,90	3,35	3,26

Le tableau ci-après groupe les dosages ayant porté, en outre, sur les acides lipoïques.

Sérum : 10 centimètres cubes.

Sang total (méthode acétone savons d'argent) : 12 gr. 029.

Sang total (méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat) : 11 gr. 283.

Sur 1000 de sang ou de sérum (néphrites diverses) :

	SANG TOTAL		SÉRUM			
	Mét. Acét. Sav. d'Arg.	Mét. Kumag. Suto	Mét. Acét. Sav. d'Arg.	Mét. Kumag. Suto	Mét. Acét. Sav. d'Arg.	Mét. Kumag. Suto
	—	—	—	—	—	—
Lécithine . . .	2,58	2,53	1,50	1,48	2,01	1,98
Cholestérine . .	3,31	3,35	2,63	2,67	3,22	3,20
Acides lipoïques totaux	7,37	7,34	5,41	5,45	6,59	6,54

CONCLUSIONS

La première partie de ce travail a été consacrée à l'examen des méthodes qualitatives et quantitatives utilisées pour mettre en évidence et doser les matières grasses du sang.

Dans la période ancienne, les savants cherchaient à extraire les corps gras et à en isoler les principes définis, en faisant subir au sang frais ou desséché des extractions et des séparations par l'emploi combiné de l'alcool et de l'éther.

Un peu plus tard, la saponification raisonnée, introduite par Chevreul, fit faire un grand progrès à l'étude des graisses en général, dont celles du sang bénéficièrent bientôt, grâce aux travaux de Gobley, Hoppe Seyler, etc.

La saponification est aujourd'hui appliquée dans tous les cas et toutes les méthodes. Combinée à l'emploi judicieux des solvants, alcool, éther, chloroforme, benzène, éther de pétrole, etc..., elle a permis, non seulement une extraction totale des graisses, mais leur différenciation et le dosage exact de certains de leurs principes définis. C'est ainsi qu'à l'heure actuelle on admet dans le sang les principes suivants : parmi les lipoïdes, la lécithine distéarocholinique (libre et combinée?) et la cholestérine en partie libre, en partie combinée, sous forme protéique ou d'éther, les graisses neutres, les acides gras libres en plus faible proportion, peut-être les savons de ces acides en quantité plus faible encore.

De l'étude historique à laquelle nous nous sommes livré, il ressort donc que l'alcool a été utilisé par tous les auteurs qui se sont occupés du sang pour en faire l'analyse. Les méthodes les plus récentes donnent la préférence à ce liquide,

notamment en ce qui regarde l'extraction des matières grasses.

Généralement quand on intervient sur le sang frais — auquel on est obligé d'avoir recours si les résultats doivent être rapportés au sang circulant — on utilise l'alcool en deux temps opératoires : le premier a pour effet de précipiter les matières protéiques en ajoutant son action déshydratante, le second concerne essentiellement l'extraction proprement dite.

Dans la deuxième partie de cet ouvrage, nous avons montré qu'on ne changeait rien à l'extraction totale des matières grasses en substituant l'acétone à l'alcool au premier temps opératoire.

Il y joue exactement le même rôle de précipitant des matières protéiques et de déshydratant.

Il n'y aurait donc aucun intérêt à cette substitution s'il n'en résultait des avantages. Ces avantages, sur lesquels nous nous sommes longuement expliqué, se résument en une question de durée : gain sur la durée du premier temps, puisque dès l'exécution de celui-ci, on peut immédiatement passer à l'extraction alcoolique; gain sur la durée du second temps, puisque l'extraction alcoolique se trouve abrégée du fait de l'intervention acétonique, dont l'énergie d'extraction est supérieure à celle de l'alcool à la même température (à froid).

A ces avantages, on peut opposer un inconvénient. Cet inconvénient est précisément le corollaire de la supériorité de l'acétone quant à son énergie d'extraction à froid. Non seulement, en effet, il dissout une plus grande quantité de matières grasses, ce qui est à considérer comme favorable, mais sa supériorité ne se borne pas là, et s'étend aussi à une plus grande quantité de matières étrangères, que l'éther absolu n'épargne pas non plus. En sorte que l'*extrait-éther-absolu total*, issu d'une extraction combinée acétone-alcool, est souillé d'une proportion d'impuretés supérieure à celle que l'on retrouve dans l'*extrait-éther absolu total* dérivant d'une extraction purement alcoolique.

Cet inconvénient, heureusement, est d'autant moins capable de nous priver des bénéfices de l'acétone qu'il n'en résulte aucune difficulté, ni perte de temps, pour la purification ultérieure des substances à doser. Il suffit de se conformer exactement aux indications de notre technique.

Quoi qu'il en soit, qu'on ait fait usage ou non de l'acétone, notre méthode se poursuit sans modification aucune, même dans les détails. Son nom seul serait changé, si l'acétone était supprimé, et la *méthode acétone-savons d'argent* deviendrait la *méthode savons d'argent*.

Pour arriver au dosage des acides gras totaux, notamment des acides gras fixes insolubles à poids moléculaires élevés que nous avons appelés *acides lipoïques* (premier objet de notre méthode), la saponification a été considérée jusqu'ici comme de toute nécessité, depuis l'époque où on a tenté leur séparation et leur dosage (Gobley 1851, Hoppe Seyler 1872, etc.). Ceci s'explique si l'on songe qu'une partie de ces acides, et même la plus importante, existe dans le sang à l'état de graisses neutres, éthers triglycérides, auxquels nous avons donné le nom de *lipoïnes*.

A notre tour, nous avons obéi, comme tous les chimistes qui ont étudié les matières grasses, à cette nécessité, et, de plus, comme la plupart des hématologues, nous faisons porter cette saponification sur l'extrait d'éther retiré, après coup, de l'extraction, extrait d'éther où se trouvent réunies toutes les *liposes*, nom sous lequel nous désignons l'ensemble des lipoïnes et les lipoïdes.

Encore à l'exemple de nos devanciers, depuis les plus anciens jusqu'aux contemporains, nous réunissons les acides gras et l'insaponifiable dans l'éther, au moyen de l'action d'un acide minéral. Nous avons choisi l'acide nitrique, conseillé par Grimbert et Laudat, parce qu'il permet un dosage plus immédiat de la lécithine (deuxième objet de notre méthode).

Il convient maintenant de doser les acides gras et l'insaponifiable encore mélangés.

Les uns transforment les acides en savons d'alcalis et en isolent l'insaponifiable par l'éther (Hoppe Seyler) ou le pétrole (Kumagawa-Suto-Shimidzu : après purification du mélange par le pétrole), et obtiennent les acides gras *par différence* en retranchant l'insaponifiable de la somme.

Les autres engagent l'insaponifiable (cholestérine) dans une combinaison insoluble (Windaus) d'où ils calculent la cholestérine. Ce qui permet ensuite d'en déduire, toujours *par différence*, les acides gras.

Nous avons imaginé d'obtenir la séparation et de doser chacun de leur côté, et non plus par différence, les acides gras et l'insaponifiable, en transformant ceux-là en savons d'argent. Nous opérons en milieu alcoolique où ces savons d'argent sont insolubles. On en extrait les acides lipoïques qui sont pesés à part. L'insaponifiable (troisième objet de notre méthode), à son tour, est isolé de l'alcool, où il est demeuré en solution, et pesé.

Cette méthode est rigoureuse sur un mélange d'acides lipoïques et de cholestérine purs, comme nous l'avons démontré.

Elle l'est encore quand elle est exécutée sur le mélange pur de ces corps, obtenus en suivant la technique de Kumagawa-Suto : extraction-alcool, saponification, purification par le pétrole.

Elle l'est aussi, quand on fait précéder l'extraction à l'alcool, par l'extraction à l'acétone, en conservant la purification au pétrole *avant* la transformation en savons d'argent.

Elle l'est enfin, même si cette purification préalable n'est pas exécutée, mais à la condition de la faire intervenir *après*, sur les acides gras bruts dégagés des savons d'argent et en respectant, bien entendu, les instructions formulées à ce propos.

De l'ensemble de nos expériences, longuement décrites, nous pouvons déduire le schéma synthétique ci-après, relatif à notre méthode :

I. — **Extraction.**

1° *Précipitation et déshydratation acétonique*. — 10 à 20 centimètres cubes de sang ou de sérum sont précipités dans un volume dix fois plus considérable d'acétone. On filtre dès que le précipité s'est rassemblé (10 à 15 minutes).

La *solution acétone* est distillée, soit seule si l'on veut récupérer l'acétone isolément ou ne pas attendre l'extraction alcoolique, soit mélangée à la *solution-alcool* obtenue ci-après, et dont le volume est beaucoup moindre, d'où perte en alcool peu considérable. Cette dernière solution alcoolique peut encore être mélangée à la solution acétonique seulement quand la plus grande partie de l'acétone a été chassée et est presque entièrement devenue solution aqueuse. Ceci offre

alors double avantage : récupération de l'acétone, qui se sépare de l'eau, obtention rapide de l'extrait sec par suite du départ simultané du mélange éthylo-aqueux.

2° Après léger lavage à l'alcool sur la cartouche filtrante, elle-même, afin d'éliminer l'acétone d'imprégnation(*), *extraction à l'alcool du précipité protéique*, au moyen d'un appareil continu (appareil Kumagawa-Suto) dont il résulte une *solution-alcool*, laquelle est, ou bien :

A) Traitée conformément à 1°, suivant chaque cas particulier adopté :

B) Distillée (avantage de la récupération de l'alcool) jusqu'à obtention d'un extrait sec.

3° Tous les extraits secs précédents (obtenus à la température réglée de 50° centigrades sont épuisés à l'éther absolu, lequel donne lieu à un *extrait sec éther absolu total* (**) qui subit la

II. — **Saponification alcoolique** :

1° Évaporation de l'alcool;

2° Reprise par l'eau chaude nitrique;

3° Épuisement de l'eau nitrique par l'éther, ce qui donne lieu à une *solution-éther* et une *solution-aqueuse nitrique*;

4° Traitement de la solution-aqueuse nitrique : dosage du phosphore et de la *lécithine* correspondante;

5° Évaporation de l'éther, préalablement lavé au citrate de soude, dont on fait un *extrait sec éther aqueux acide* (acides + insaponifiable);

6° Reprise par l'alcool bouillant;

7° Neutralisation de la *solution-alcool* par la soude ou la potasse en solution alcoolique (titrée ou non) en présence de phtaléine comme indicateur.

(*) L'alcool acétonique de filtration doit être joint soit à la solution acétone avant distillation, soit à la portion aqueuse qui reste après cette distillation, et l'on peut, dans ce cas, distiller à part la solution alcool proprement dite pour en récupérer l'alcool.

(**) Cet extrait varie un peu de poids suivant le mode adopté pour sa formation, mais il contient toujours la totalité des liposes.

III. — Précipitation argentique. — Formation des savons d'argent.

1° Les acides gras et la majorité des impuretés sont précipités, à l'abri de la lumière naturelle (papier noir entourant les vases ou chambre noire), par une solution alcoolique saturée de nitrate d'argent, jusqu'à virage, *à la touche*, de chromate de potasse.

2° Filtration sur papier, ce qui donne lieu à la séparation des acides gras sous forme de *savons argentiques*, d'une part, et de l'*insaponifiable* (*cholestérine*), demeuré en solution alcoolique, d'autre part.

IV. — Traitement des savons d'argent. — Extraction et dosage des acides lipoïques.

1° Les savons d'argent, réunis sur le filtre, sont introduits avec lui dans un mélange d'eau nitrique et d'éther. Les acides gras, immédiatement déplacés, sont dissous par l'éther avec une certaine quantité d'impuretés;

2° Évaporation de l'éther, préalablement lavé avec une solution de citrate de soude. Formation de *l'extrait sec aqueux acide* (dessiccation complète à 50°).

3° Reprise par l'éther de pétrole.

4° Évaporation et dosage des *acides lipoïques*.

V. — Traitement de la solution alcoolique. Extraction et dosage de l'insaponifiable.

1° Neutralisation par la soude ou la potasse alcoolique de la solution, en présence de la phtaléine qu'elle contient déjà;

2° Filtration sur papier;

3° Évaporation à sec de l'alcool (dessiccation complète à 100°);

4° Reprise par l'éther de pétrole;

5° Évaporation et dosage de l'*insaponifiable* (*cholestérine*).

Des opérateurs habitués au laboratoire exécutent facilement la série de ces manipulations. Bien conduites, elles ne réclament pas plus de temps que l'application de méthodes comme celle de Kumagawa-Suto-Shimidzu, quand on néglige l'emploi de l'acétone pour l'extraction, et en demande moins, si l'acétone précède l'alcool à propos de cette même extraction.

La précision de la méthode acétone-savons d'argent est d'ailleurs identique à celle de Kumagawa-Suto-Shimidzu, à laquelle elle a été d'ailleurs comparée.

Elle présente, en outre, l'avantage incontestable sur la plupart des autres méthodes de doser d'une manière indépendante les acides lipoïques d'un côté, l'insaponifiable de l'autre, au lieu de les doser par différence, ce qui fait dépendre leur évaluation d'une erreur possible portant sur l'un ou sur la somme des deux.

En résumé, des vérifications et des comparaisons auxquelles nous nous sommes livré, il résulte que notre méthode atteint la précision des procédés les plus précis ordinairement employés pour évaluer les mêmes principes qu'elle s'est donné pour but elle-même. Elle n'a pas été créée dans l'intention de remplacer les techniques auxquelles les chimistes accordent généralement leur confiance. Comme elle fournit le moyen de doser chaque substance, parallèlement, et pour son propre compte, et non, corrélativement, c'est-à-dire sans qu'on soit obligé de passer par le dosage des autres, elle nous paraît présenter un intérêt particulier, notamment au point de vue pratique, puisque d'une erreur entachant un dosage ne pourra résulter, si on emploie notre méthode, une seconde erreur pour le dosage suivant.

Vu : le Président,
DESGREZ

Vu : le Doyen,
LANDOUZY

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

INTRODUCTION . . . . . .

CHAPITRE I. — **Le sang et l'économie**. 1
§ 1. — Solidarité dans l'état de santé et l'état de maladie . . 1
§ 2. — Comparaison entre le sang circulant et le sang épanché. 4
§ 3. — Utilité de l'analyse du sang 6
§ 4. — Matières grasses du sang. — Lipoïdes. 10
§ 5. — Origine et rôle des hémolipoïdes. 11
§ 6. — Ce que nous entendons par liposes, lipoïnes et acides lipoïques 16
§ 7. — But que nous nous proposons d'atteindre. 18

CHAPITRE II. — **Quelques considérations sur l'analyse et la composition générale du sang depuis les époques de début jusqu'au seuil de l'époque contemporaine**. . . . 20

PREMIÈRE PARTIE. — **Les matières grasses du sang** 29
Historique. Méthodes d'analyses. Réflexions suggérées . . . 29

CHAPITRE I. — **Période ancienne** 30
John Hunter 30
Parmentier et Deyeu. 32
Berzélius. 32
Chevreul 33

CHAPITRE II. — **Période moderne**. 36
Le Canu 36
Boudet 39
Denis. 42
L'Héritier. 48
Gobley 49
Le Canu (déjà cité) 58
Denis (déjà cité). 59
Conclusions concernant les périodes ancienne et moderne. . 62

CHAPITRE III. — **Période pré-contemporaine** 65
Hermann 67
Hoppe Seyler 67

Chapitre IV. — **Période contemporaine ou actuelle** 74
Hepner. 74
Hurthle. 75
Pfluger. Dormeyer. Rosenfeld Liebermann et Szekely. . . . 78
Kumagawa-Suto-Shimidzu. 79
Windaus 83
Grigaut. 84
Er. Gérard 90
Iscovesco 93
Grimbert et Laudat 95
Conclusions concernant la période contemporaine. 102

DEUXIÈME PARTIE. — **Sur notre méthode ou méthode acétone savons d'argent.**

Chapitre I. — **Des origines de notre méthode** 107
§ 1. — Considérations générales sur le choix du principe d'une méthode rationnelle 107
§ 2. — Sur l'extraction des liposes 110
§ 3. — Pourquoi et comment, dans notre méthode, l'acétone a été partiellement substitué à l'alcool dans l'extraction des liposes. 118
Expériences sur le jaune d'œuf 118
Expérience sur le blanc d'œuf. 125
Action précipitante de l'acétone sur les peptones. . . . 127
Action précipitante de l'acétone sur le lait 128
§ 4. — Sur les proportions relatives du mélange sang-acétone. 129
§ 5. — Hypothèses sur le mécanisme comparé de l'action de l'alcool et de l'acétone sur les milieux albumineux. . 134
§ 6. — Etat et conservation du sang soumis à nos expériences. 136

Chapitre II. — **Exposé du principe de la méthode acétone-savons d'argent** 140
§ 1. — Extraction totale des liposes. — Isolement de chaque groupe de liposes : lécithinique, cholestérique, lipoïque. 140
I. — Traitement de la solution acétonique 141
II. — Traitement de la solution-alcool. 142
III. — Traitement des solutions-éther. — Saponification. . . . 142
IV. — Traitement de l'extrait-éther acide issu de la saponification 143
§ 2. — Dosage des acides lipoïques purs en solution alcoolique par formation de leurs savons d'argent. 146
Essais qualitatifs 146
Epreuves quantitatives. 149
A. — Acide oléique Epreuve 1 150
— Epreuve 2 153
— Epreuve 3 154
B. — Acide stéarique Epreuve 1. 154
— Epreuve 2 155
§ 3. — Dosage des acides lipoïques et de la cholestérine dans leur mélange. 157
A. — Acide palmitique et cholestérine Epreuve 1 157
— Epreuve 2 161

B. — Acide stéarique et cholestérine Epreuve 1. 161
— Epreuve 2 162
C. — Acide oléique et cholestérine 162
§ 4. — Réflexion générales sur le dosage de la cholestérine et des acides lipoïques par la méthode Acétone-savons d'argent. 162
§ 5. — Traitement direct, par le nitrate d'argent en solution alcoolique, de l'extrait-éther absolu acide neutralisé, sans passer par l'éther de pétrole 167
§ 6. — Traitement de la première liqueur-aqueuse nitrique d'où sont extraits les acides lipoïques et l'insaponifiable . 169

CHAPITRE III. — **Étude expérimentale de la méthode Acétone-savons d'argent** 171
Expériences sur le sang de cheval. 173
Premier groupe d'expériences :
Expérience 1. — Méthode Acétone-savons d'argent 174
I. — Extraction. 174
II. — Saponification de l'extrait-éther total. 181
III. — Précipité argentique. — Formation des savons d'argent . 182
IV. — Traitement du précipité argentique. 184
V. — Traitement de la solution-alcool résultant du lavage du précipité argentique 190
VI. — Traitement de la portion aqueuse nitrique d'où l'on a séparé par l'éther les acides lipoïques et l'insaponifiable, après saponification du premier extrait éther absolu. Dosage de la lécithine. 194
VII. — Traitement du précipité protéique provenant de l'action de l'acétone sur le sérum. 196
Tableau-résumé de l'expérience 1 197
Expérience 2. — Méthode acétone-savons d'argent 198
Expérience 3. — Méthode pondérale de Grigaut. 201
Expérience 4. — Méthode de saponification directe Grigaut modifiée 202
Tableau-résumé des expériences 1, 2, 3 et 4 du premier groupe 203
Deuxième groupe d'expériences :
Expérience 1. — Méthode Acétone-savons-d'argent 204
I. — Extraction 204
— acétonique 204
— alcoolique. 208
II. — Saponification de l'extrait éther total. 211
III. — Précipité argentique. — Formation des savons d'argent. 211
IV. — Traitement de la solution alcool insaponifiable. — Dosage de la cholestérine. 213
V. — Traitement de la solution-aqueuse nitrique issue de la saponification de l'extrait éther absolu total. Dosage du phosphore organique. 214
Expérience 2. — Méthode pondérale de Grigaut. 215
Tableau résumé des expériences 1 et 2 du deuxième groupe. . 215
Troisième groupe d'expériences :
Expérience 1. — Méthode Acétone-savons-d'argent 216
I. — Extraction acétone-alcool. 216

II. — Précipitation des savons d'argent 217
III. — Formation de la solution-alcool insaponifiable 217
Expérience 2. — Méthode pondérale de Grigaut. 220
Expérience 3. — Méthode de Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat. 220
I. — Extraction et formation de l'extrait-éther absolu 220
II. — Saponification. Extrait-éther absolu acide 221
III. — Insaponifiable. 221
IV. — Acides gras Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat transformés en savons d'argent et isolés à nouveau par notre méthode. 222
Tableau-résumé des Expériences 1, 2 et 3 du troisième groupe 224
Quatrième groupe d'expériences :
Expérience 1. — Méthode Acétone-savons d'argent avec modifications 226
Expérience 2. — Méthode pondérale de Grigaut 229
Expérience 3. — Méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat. 230
Tableau résumé des Expériences 1, 2 et 3 du quatrième groupe 232
Cinquième groupe d'expériences :
Expérience 1. — Méthode Acétone-savons d'argent 233
I. — Extraction acétone-alcool et formation de l'extrait-éther absolu total. 233
II. — Précipitation argentique et dosage des acides gras . . . 234
III. — Filtrat-alcool et dosage de l'insaponifiable 235
Expérience 2. — Méthode pondérale Grigaut 235
Expérience 3. — Méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat. 235
Expérience 4. — Méthode Acétone-savons d'argent 236
I. — Extraction acétone-alcool et formation de l'extrait-éther absolu total. 236
II. — Formation des savons d'argent. 236
III. — Dosage des acides gras et de l'insaponifiable. 237
Expérience 5. — Méthode Acétone-savons d'argent 237
I. — Extraction acétone-alcool. Extrait-éther absolu total. Saponification 237
II. — Précipitation argentique. Extrait pétrole-acide et insaponifiable. 238
Expérience 6. — Méthode Kumagawa-Suto-Shimidzu et Grimbert-Laudat. 238
Tableau-résumé des expériences 1, 2, 3, 4, 5 et 6 du cinquième groupe 239
Expérience 7. — Méthode Acétone-savons-d'argent modifiée. 241
I. — Extraction acétone-alcool. Saponification. Pas de reprise à l'éther après saponification. 241
II. — Filtrat-alcool 242
III. — Traitement du précipité argentique 242
Tableau-résumé de l'expérience 7. 244
Tableau-résumé des 5 groupes d'expériences faisant l'objet du Chapitre III. 246

Méthodes employées 247
Rapports de la cholestérine, des acides lipoïques et de leurs sommes à 100 parties de l'extrait-éther absolu correspondant 252
Expérience indépendante sur le sang total du cheval 253

Chapitre IV. — I. **Justification expérimentale de l'emploi du citrate de soude dans la purification des acides lipoïques.**
§ 1. — Action du citrate de soude sur l'acide lactique 255
§ 2. — Action négative du citrate de soude sur l'acide stéarique. 257

II. — **Démonstration de l'importance de la dessiccation complète des mélanges lipoïques et cholestérique quand il s'agit de purifier les acides lipoïques et la cholestérine par l'éther de pétrole** . . . . . 257.

Chapitre V. — **Application de la méthode Acétone-savons d'argent au sang humain** 260

Conclusions 264

Paris. — Imp. Vigot Frères, 23, rue de l'École-de-Médecine.